

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

# **MONITOROVÁNÍ PRŮBĚHU SUBLINGVÁLNÍ ALERGENOVÉ IMUNOTERAPIE POMOCÍ SLEDOVÁNÍ HLADIN SPECIFICKÝCH IgG PROTILÁTEK**

## **MONITORING OF SUBLINGUAL ALLERGEN IMMUNOTHERAPY USING SERUM LEVELS OF ALLERGEN SPECIFIC IgG ANTIBODIES**

**Bc. Nikol Bouzková**

**Vedoucí diplomové práce: Mgr. Karolína Jankovičová, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2023**

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Mgr. Karolíně Jankovičové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, věnovaný čas, cenné rady a vstřícný přístup. Panu prof. RNDr. Ctiradu Andrýsovi, Ph.D. děkuji za odborné rady a pomoc při vypracování statistické analýzy. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Ireně Krčmové, CSc. za sestavení souboru pacientů pro tuto práci a za poskytnutí informací ze zdravotnické dokumentace těchto pacientů. V neposlední řadě děkuji své rodině za pomoc a podporu po celou dobu mého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 30. 4. 2023

Nikol Bouzková

# 1. OBSAH

1. OBSAH.....	4
2. ABSTRAKT.....	7
3. ABSTRACT.....	8
4. ÚVOD.....	9
5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	10
6. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
6.1 Základní pojmy.....	11
6.1.1 Alergie.....	11
6.1.2 Anafylaxe.....	11
6.1.3 Atopie.....	12
6.1.4 Alergen.....	12
6.1.4.1 Alergeny pylů trav.....	13
6.2 Imunopatogeneze alergického zánětu.....	14
6.2.1 Fáze alergického zánětu.....	14
6.2.1.1 Senzibilizace.....	14
6.2.1.2 Opakovaný kontakt s alergenem.....	14
6.2.2 Buňky účastnící se alergického zánětu.....	15
6.2.2.1 Žírné buňky a bazofily.....	15
6.2.2.2 Eozinofily.....	17
6.2.2.3 Subsety pomocných T lymfocytů.....	18
6.2.2.4 B lymfocyty.....	22
6.2.3 Protilátková odpověď .....	24
6.2.3.1 IgE protilátky.....	25
6.2.3.2 IgG protilátky a jejich podtřídy.....	26
6.2.4 Respirační formy alergického zánětu.....	29
6.2.4.1 Alergická rhinitida.....	29
6.2.4.2 Astma bronchiale.....	30
6.2.5 Specifická alergenová imunoterapie.....	31

6.2.5.1 Princip.....	31
6.2.5.2 Alergeny používané v SAIT.....	32
6.2.5.3 Imunobiologický mechanismus účinku SAIT.....	32
6.2.5.4 Formy provedení SAIT.....	33
6.2.5.5 Indikace SAIT.....	35
6.2.5.6 Kontraindikace SAIT.....	36
6.2.5.7 Hodnocení účinku SAIT.....	37
<b>7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>39</b>
7.1 Charakteristika sledovaného souboru.....	39
7.2 Oralair – informace, schéma užívání.....	40
7.3 Metodika.....	40
7.3.1 Odběry a zpracování vzorků.....	40
7.3.2 Vizuelní analogová škála (VAS).....	41
7.3.3 Stanovení specifických IgG4 proti pylovým alergenům.....	41
7.3.3.1 Princip stanovení.....	41
7.3.3.2 Vybavení a materiál.....	41
7.3.3.3 Postup stanovení.....	42
7.3.4 Stanovení specifických IgG1, IgG2 a IgG3 proti pylovým alergenům.....	43
7.3.4.1 Princip stanovení.....	43
7.3.4.2 Vybavení a materiál.....	44
7.3.4.3 Postup stanovení.....	44
7.3.5 Metoda statistického hodnocení.....	45
<b>8. VÝSLEDKY.....</b>	<b>46</b>
8.1 Výsledky VAS.....	46
8.2 Výsledky stanovení sIgG4.....	47
8.2.1 Výsledky stanovení sIgG4 proti směsi pylů trav (GX1).....	47
8.2.2 Výsledky stanovení sIgG4 proti bojínku (G6).....	50
8.3 Výsledky stanovení sIgG1.....	54
8.3.1 Výsledky stanovení sIgG1 proti směsi pylů trav (GX1).....	54
8.3.2 Výsledky stanovení sIgG1 proti bojínku (G6).....	56
8.4 Výsledky stanovení sIgG2.....	58
8.4.1 Výsledky stanovení sIgG2 proti směsi pylů trav (GX1).....	58
8.4.2 Výsledky stanovení sIgG2 proti bojínku (G6).....	60

8.5 Výsledky stanovení sIgG3.....	62
8.5.1 Výsledky stanovení sIgG3 proti směsi pylů trav (GX1).....	62
8.5.2 Výsledky stanovení sIgG3 proti bojínku (G6).....	64
9. DISKUSE.....	66
10. ZÁVĚR.....	72
11. POUŽITÉ ZKRATKY.....	73
12. SEZNAM TABULEK.....	76
13. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	77
14. SEZNAM GRAFŮ.....	78
15. POUŽITÁ LITERATURA.....	79

## 2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Autor:** Bc. Nikol Bouzková

**Vedoucí práce:** Mgr. Karolína Jankovičová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Monitorování průběhu sublingvální alergenové imunoterapie pomocí sledování hladin specifických IgG protilátek

Prvním cílem diplomové práce bylo zhodnotit klinický průběh sublingvální alergenové imunoterapie (SLIT). Dalším cílem bylo vyhodnotit změny protilátkové odpovědi v čase a porovnat výsledky souboru léčeného Oralirem s kontrolním souborem pacientů. V neposlední řadě si práce kladla za cíl zhodnotit změny hladin specifických IgG protilátek v souvislosti s klinickým průběhem SLIT.

Pro klinické hodnocení alergických symptomů byla použita vizuální analogová škála (VAS). sIgG4 proti alergenům pylu trav byly stanoveny komerčně dostupnou ELISA metodou. sIgG1, sIgG2 a sIgG3 byly vyšetřeny vlastně vytvořenou a ověřenou ELISA. Na základě výsledků byla provedena statistická analýza.

Bylo zjištěno, že terapie Oralirem byla klinicky účinná od první léčebné sezóny. Výsledky VAS ukázaly, že mezi soubory léčených a kontrolních pacientů existuje statisticky významný rozdíl projevů alergických příznaků. U léčených pacientů byl pozorován významný nárůst sIgG4, přičemž mezi výsledky obou souborů byly významné odlišnosti. Zvýšení sIgG4 odpovídalo kladnému hodnocení klinického průběhu SLIT léčených pacientů. Některé významné změny byly nalezeny i u výsledků sIgG1 a sIgG2, které by mohly souviset s navozením tolerance a zmírněním alergických projevů. Hladina sIgG3 se při SLIT významně neměnil.

**Klíčová slova:** Alergenová imunoterapie, specifické IgG protilátky, ELISA technika, alergie na pylly trav

### 3. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

**Author:** Bc. Nikol Bouzková

**Supervisor:** Mgr. Karolína Jankovičová, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Monitoring of sublingual allergen immunotherapy using serum levels of allergen specific IgG antibodies

The first aim of the thesis was to evaluate the clinical course of sublingual allergen immunotherapy (SLIT). Another aim was to assess the changes in antibody response over time and to compare the results of the Oralair treated group with the control group. Last but not least, the aim of the thesis was to evaluate the changes in the levels of specific IgG antibodies in relation to the clinical course of SLIT.

The visual analogue scale (VAS) was used for the clinical assessment of allergic symptoms. A commercially available ELISA method was used to determine sIgG4 against grass pollen allergens. sIgG1, sIgG2 and sIgG3 were determined by an in-house developed and validated ELISA. Based on the results, statistical analysis was performed.

It was found that Oralair therapy was clinically effective from the first season of the treatment. The VAS results showed that there was a statistically significant difference in the manifestation of allergic symptoms between the treatment and the control group. A significant increase in sIgG4 was found in the treated group, and there were significant differences between the results of the two groups. The increase in sIgG4 was corresponding to the positive clinical course of SLIT treated patients. Some significant changes were also found in the results of sIgG1 and sIgG2, which could be related with the induction of tolerance and the alleviation of allergic symptoms. The level of sIgG3 did not significantly affected during SLIT.

**Key words:** Allergen immunotherapy, allergen specific IgG antibodies, ELISA, grass pollen allergy



## 4. ÚVOD

V léčbě alergických onemocnění, jejichž prevalence má celosvětově stále rostoucí tendenci, představuje alergenová imunoterapie jediný kauzální způsob léčby. Jedná se o široce uznávanou formu terapie alergie I. typu, zejména těžké sezónní alergické rýmy způsobené inhalačními alergeny či alergie na jed blanokřídlého hmyzu.

Účinek alergenové imunoterapie je založen na navození dlouhotrvající klinické a imunologické alergen-specifické tolerance, jež vede ke snížení alergických symptomů, menšímu používání konvenční antialergické medikace a celkově ke zlepšení kvality života i po ukončení léčby. I přestože mechanismy působení této léčby nejsou ještě plně pochopeny, klinická účinnost alergenové imunoterapie je dobře prokázána na velkém počtu studií. Stále však neexistují jasně dané parametry laboratorního hodnocení, které by byly prognostické, prediktivní a/nebo by zastupovaly klinické hodnocení účinnosti alergenové imunoterapie. Ve snaze dokumentovat průběh a úspěšnost léčby nebo dokonce přispět k jejímu dalšímu vývoji, byly navrženy a v řadě studií používány potencionální biomarkery pro objektivní monitorování alergenové imunoterapie. Navrhované biomarkery vycházejí z dosavadních znalostí o imunomodulačních mechanismech SAIT. Tvorba specifických sIgG, zejména podtřídy sIgG4, je považována za jeden z klíčových mechanismů, který vede k navození tolerance příčinného alergenu.

Tato diplomová práce je zaměřena na monitorování průběhu sublingválně podávané alergenové imunoterapie u pacientů s prokázanou alergií na pylly trav. Sledovaným parametrem byly hladiny specifických IgG protilátek, kde byla v první řadě monitorována protilátková odpověď podtřídy IgG4. Dále byly sledovány změny i v dalších podtřídách (IgG1, IgG2, IgG3). Současně byly v některých naplánovaných odběrech získány výsledky stanovení jednotlivých podtříd specifických IgG protilátek proti pylům trav i od kontrolního souboru pacientů, se kterým bylo možné výsledky léčených pacientů porovnat. Výsledné změny protilátkové odpovědi vyvolané během imunoterapie byly hodnoceny v čase a v souvislosti s klinickým průběhem alergenové imunoterapie.

## **5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE**

1. cíl: Zhodnotit klinický průběhu sublingvální alergenové imunoterapie.
2. cíl: Vyhodnotit změny protilátkové odpovědi v čase a porovnat výsledky souboru léčeného Oralirem s kontrolním souborem pacientů.
3. cíl: Vyhodnotit změny hladin specifických IgG protilátek v souvislosti s klinickým průběhem alergenové imunoterapie.

## 6. TEORETICKÁ ČÁST

### 6.1 Základní pojmy

#### 6.1.1 Alergie

Dnes je alergie definována jako hypersenzitivní, přehnaná odpověď organismu, kdy imunitní systém predisponovaného jedince nepřiměřeně reaguje na látky pocházející ze zevního prostředí. (Špičák et al., 2007). Alergického poškozujícího zánětu se účastní humorální i buněčná část imunitního systému a je spojován s produkcí specifických alergenních protilátek typu IgE (imunoglobulin E). (Krejsek et al., 2016)

Imunopatologická onemocnění, kterým alergie je, se dělí do hlavních 4 kategorií. Současná rozšířená podoba klasifikace dle Gella a Coombse rozděluje různé stavy přecitlivělosti do 6 kategorií. Většina alergických onemocnění, jako je alergická rýma, astma, potravinová alergie, ekzém, se dle klasifikace řadí mezi imunopatologické reakce I. typu, též nazývané jako reakce časně přecitlivělosti. Některé druhy dermatitidy jsou způsobeny opožděnou reaktivitou, kde se jedná o IV. typ imunopatologické reakce. (Delves et al., 2017)

#### 6.1.2 Anafylaxe

Jednou z forem projevu alergického zánětu je i náhle vznikající, generalizovaná anafylaktická reakce. Jedná se o vystupňovanou alergickou reakci, která je provázena silnou bronchokonstrikcí, kontrakcí hladkého svalstva, dilatací kapilár, otokem laryngu a dalšími život ohrožujícími symptomy. Můžeme se s ní setkat u jedinců, kteří jsou silně přecitlivělí na alergeny hmyzího bodnutí, potraviny, léky či pyly. V případě poskytování první pomoci je zásadní včasné podání adrenalinu, který ruší systémové působení histaminu. Pacienti, kteří jsou ohroženi anafylaxí, by u sebe měli nosit autoinjektory s adrenalinem, aby si je mohli v případě potřeby aplikovat. (Delves et al., 2017; Krejsek et al., 2016)

### 6.1.3 Atopie

Atopie není nemoc, ale dědičná vlastnost, vyskytující se charakteristicky v rodinách. Jako atopik je označován jedinec, který má geneticky danou dispozici k tvorbě IgE protilátek v odpovědi na alergeny, a tak i zvýšenou pravděpodobnost, že se u něj rozvine některé z alergických onemocnění. (Hořejší et al., 2017)

Alergie je obecně považována za multifaktoriální onemocnění. Rozsáhlými studii bylo dědičný základ alergie opakovaně prokázán a díky tomu také identifikovány stovky genů související s její patogenezi. Kromě atopického genotypu se na jejím vzniku a rozvoji také významně podílejí faktory vnějšího prostředí. Takovými faktory mohou být např. složení střevního mikrobiomu, hygienické standardy, znečištění životního prostředí, nedostatek přirozených infekčních podnětů a hledání nových cílů reaktivity nebo i infekce, které mohou alergický zánět iniciovat. (Krejsek et al., 2016; Špičák et al., 2007)

### 6.1.4 Alergen

Pojmem alergen je označován jakýkoliv exogenní antigen, schopný navodit u přecitlivělého organismu imunitní odpověď v podobě alergické reakce. Převážně se jedná o proteiny a glykoproteinové alergeny, které jsou schopné reagovat s IgE protilátkami. Alergeny jsou většinou složeny z více komponent a každá z nich může být potencionálně alergenní. (Krejsek et al., 2016) Alergenicitu daného proteinu je závislá na individuální senzibilitě organismu, načasování expozice, na dávce, délce působení a na kontextu expozice. Zdá se, že vedle struktury proteinu hrají roli i některé další vlastnosti, jako např. schopnost tvorby specifických typů glykosylace a vazby lipidů. Bylo zjištěno, že lipidové ligandy a konjugované glykany interagují s receptory rozpoznávající patogen, jako jsou TLR (Toll-like receptory) a CLR (C-lektinové receptory) na buňkách prezentujících antigen. (van Ree, 2014)

Primárními senzibilizátory nazýváme takové alergeny, které přímo indukují tvorbu alergen-specifických IgE (sIgE) protilátek. Nesenzibilizující alergeny jejich tvorbu nevyvolávají, ale i přesto mohou za určitých podmínek navodit alergické projevy. (van Ree, 2014) Děje se tak na základě předchozího kontaktu s podobným alergenem,

při němž se sIgE již vytvořily. Molekuly alergenů, často patřící do jedné proteinové rodiny, sdílejí některé epitopy, a proto se sIgE mohou vázat na podobné struktury alergenů, které pocházejí z různých rostlinných a živočišných zdrojů. Tento fenomén je označován jako zkřížená reaktivita. (Matricardi et al., 2016)

#### **6.1.4.1 Alergeny pylů trav**

Pyly různých travin se celosvětově řadí mezi hlavní příčiny sezónních inhalačních alergií. Největší zátěž představují během období jejich květu, zpravidla to bývá od začátku do poloviny léta. (Andersson et al., 2003) Mezi nejčastější alergizující druhy trav, které rostou na území České republiky, patří např.: bojínek luční, jílek vytrvalý, srha laločnatá, tomka vonná, lipnice luční a další. (Bystroň, 2006) V mnoha případech mají alergeny nalezené u jednoho druhu své homology u jiných druhů, což způsobuje jejich vzájemnou zkříženou reaktivitu. Vysokou úroveň homologie vykazuje podčeleď Pooideae, zatímco u alergenů z jiných podčeledí (v rámci čeledi Poacea) je míra podobnosti spíše nižší. (Hrabina et al., 2008)

Na základě podobnosti fyzikálně-chemických a imunologických vlastností byly alergeny pocházející z jednoho nebo více druhů trav rozděleny do 11 skupin. Za hlavní alergeny jsou považovány alergeny patřící do skupin 1 a 5. Přibližně 90 % jedinců hypersenzitivních na travní pyl vykazuje reaktivitu protilátek IgE na alergeny skupiny 1. Prevalence senzibilizace na alergeny skupiny 5 se mezi různými skupinami pacientů pohybuje mezi 65–85 %. Společně alergeny těchto dvou skupin tvoří více než 80 % alergenů pylů trav a jsou tak hlavní cíle při navrhování alergenové imunoterapie. Část pacientů však může být senzibilizována i dalšími alergeny trav patřícími do skupin 2–4, 6 a 7–13. (Andersson et al., 2003; Hrabina et al., 2008)

## **6.2 Imunopatogeneze alergického zánětu**

### **6.2.1 Fáze alergického zánětu**

#### **6.2.1.1 Senzibilizace**

Aby mohlo dojít k senzibilizaci daného jedince, musí nejprve alergen proniknout do organismu. První linii obrany při setkání s cizorodým agens zabezpečují epitelové buňky, hlavně kožního, dýchacího a zažívacího systému. Pro rozpoznání alergenních molekul využívají buňky epitelu receptory PRR (receptory rozeznávající molekulové vzory) a PAR (proteázou aktivované receptory). (Krejsek et al., 2016) „*Alergeny schopné proniknout do cytoplazmy epitelových buněk mohou být rozpoznány cytoplazmatickými NLR receptory s následnou aktivací inflamomasu.*“ (Krejsek et al., 2016 s. 216) Prostřednictvím interakce receptoru s alergenem začnou aktivované epitelie produkovat prozánětlivé mediátory, které působí jako stimulanty a chemoatraktanty na ostatní buňky imunitního systému. Pod vlivem mediátorů se aktivují i reziduální dendritické buňky. Tyto buňky mají schopnost prezentovat antigenní peptidy pocházející z alergenů pomocí svých HLA molekul. Migrují do lymfatických orgánů, kde předkládají antigen naivním CD4<sup>+</sup> T lymfocytům (naivním pomocným T lymfocytům – Th0), ze kterých se pod vlivem cytokinů diferencují Th2 (pomocné T lymfocyty subtypu 2). Ty následně podporují maturaci specifických B lymfocytů v plazmatické buňky. Takto zralé plazmocyty secernují sIgE a další třídy protilátek. Cirkulující IgE se poměrně rychle navazují na vysokoafinní receptory pro IgE protilátky (FcεRI) žírných buněk a bazofilních granulocytů. (Krejsek et al., 2016)

#### **6.2.1.2 Opakovaný kontakt s alergenem**

Opakovaná expozice příčinného alergenu vede u pacienta k rychlému rozvoji zánětlivých procesů. Po průniku alergenních struktur narušenou epiteliální bariérou nastává jejich interakce s IgE ukotvenými na povrchu žírných buněk nebo bazofilů. Vlivem přemostění sousedních molekul IgE dochází k přiblížení intracelulárních částí FcεRI receptorů a následné fosforylaci sekvence ITAM aktivovanými kinázami Lyn. Tato reakce spustí kaskádu dějů, které vedou k exocytóze granul efektorových buněk.

Z granul se okamžitě uvolní prefabrikované mediátory, hlavně histamin, heparin, tryptáza a další anafylaktogenní látky. V další fázi dochází v rámci minut až hodin k syntéze a sekreci cytokinů, chemokinů a membránově odvozených lipidových mediátorů, jako jsou leukotrieny, prostaglandiny a faktor aktivující krevní destičky (PAF) (viz Tabulka 1). (Akdis, 2014; Krejsek et al., 2016) Uvolněním mediátorů dochází k rozvoji hypersenzitivní reakce, která bývá charakteristicky provázena klinickými příznaky, jako jsou např.: zčervenání, otok a svědění kůže; kýčání a zvýšená sekrece v horních cestách dýchacích; kašel, dušnost a otok v dolních cestách dýchacích; nevolnost, zvracení a další obtíže gastrointestinálního traktu. (Stone et al., 2010)

Pozdní reakce je doprovázena migrací eozinofilů, lymfocytů, neutrofilů a dalších imunokompetentních buněk do poškozené tkáně. V případě dlouhodobého působení alergizujících podnětů může akutní zánět přejít v chronický, který je spojován s nevratným poškozením některých tkáňových struktur. (Krejsek et al., 2016; Mackay et al., 2001)

## **6.2.2 Buňky účastníci se alergického zánětu**

### **6.2.2.1 Žírné buňky a bazofily**

Žírné buňky (mastocyty) jsou antigen-prezentující buňky (APC) nacházející se prakticky ve všech tkáních, často v blízkosti epiteliálních povrchů, krevních cév, nervů, buněk hladkého svalstva a fibroblastů. Jsou to tedy jedny z prvních buněk, které detekují přítomnost cizorodých patogenních struktur a reagují na signály poškození vnitřního prostředí. V případě infekce se účastní na zesílení imunitní odpovědi prostřednictvím vypuzení granul a následným uvolněním či syntézou mediátorů zánětu. (Delves et al., 2017; Galli, 2014) Granule obsahují většinu tělesného histaminu a heparinu a také různé proteázy. Stejně jako další imunokompetentní buňky nesou na svém povrchu řadu receptorů. Z hlediska alergického zánětu jsou to především vysokoafinní FcεRI, přes které jsou vysílány signály k degranulaci. Proces uvolnění granul však může být zahájen i některými chemickými substancemi. (Galli, 2014) Významné jsou také i receptory pro IgG protilátky FcγRII a FcγRIII. Dále jsou na jejich povrchu přítomné receptory typu TLR, NLR (NOD-like receptory), receptory

pro cytokiny, hormony, komplement a další důležité molekuly. Cytokiny a chemokiny produkované žírnými buňkami výrazně ovlivňují chování ostatních buněk imunity. Produkci interleukinů (IL4, IL-5 a IL-13) podporují diferenciaci prekurzorů T lymfocytů do subsetu Th2. Také přispívají k chemotaxi eozinofilů do místa alergického zánětu tvorbou IL-5 a eotaxinu. (Krejsek et al., 2016)

**Tabulka 1 Mediátory zánětu žírných buněk**

	produkt	biologický efekt
preformované mediátory, které se uvolňují po aktivaci (v rámci minut)	histamin	zvyšuje vaskulární permeabilitu a dilataci cév stahuje hladkého svalstva dýchacích cest způsobuje svědění a bolest ovlivňuje imunitní reakce a funkci nervů
	heparin	antikoagulant významný pro další produkty v granulích
	proteázy (např. tryptáza, chymáza, karboxypeptidáza A3)	rozkládají určité proteiny a peptidy, včetně složek živočišných jedů regulují remodelaci tkání chymáza převádí angiotenzin I na angiotenzin II
syntetizované a vylučované po aktivaci mastocytu (lipidové mediátory v rámci minut, peptidové produkty až několik hodin)	lipidové mediátory (např. leukotrieny, prostaglandiny)	regulují migraci a funkci leukocytů zvyšují vaskulární permeabilitu vyvolávají zúžení nebo dilataci krevních cév (v závislosti na typu mediátoru) stahují nebo uvolňují hladké svalstvo (dýchacích cest a gastrointestinálního traktu) zvyšují sekreci hlenu
	cytokiny, chemokiny, peptidové růstové faktory	mnoho účinků na různé buňky (leukocyty i tkáňové strukturální buňky), které podporují nebo potlačují zánět a/nebo remodelaci tkáně

*Zdroj: Galli, 2014 (upraveno a přeloženo)*



Přestože bazofilní granulocyty tvoří samostatnou linii, sdílejí některé charakteristické rysy s tkáňově lokalizovanými žírnými buňkami, jako např. přítomnost bazofilních granul v cytoplazmě, exprese FcεRI a uvolňování chemických mediátorů po aktivaci. Bazofily za homeostatických podmínek cirkulují v krevním oběhu s odhadovaným poločasem rozpadu několik dní. Je však známo, že jsou schopny pronikat do zanícené tkáně, zejména do kůže s atopickou dermatitidou a dýchacích cest při respiračních alergických onemocnění. K aktivaci může kromě agregace FcεRI docházet například přes cytokinové receptory. Dále jsou na jejich povrchu exprimovány různé komplementové, prostaglandinové a imunoglobulinové receptory. (Stone et al., 2010) Na aktivovaných bazofilech se nacházejí molekuly CD69, CD63 a ve vysoké hustotě molekuly CD203c, které se v menší míře nacházejí i na neaktivovaných buňkách. Podobně jako žírné buňky stimulují svými produkty (hlavně IL-4 a IL-13) Th2 typ imunitní odpovědi. (Krejsek et al., 2016)

#### **6.2.2.2 Eozinofily**

Eozinofily jsou terminální polymorfonukleární buňky s vysokým obsahem cytoplazmatických granulí. Diferenciace eozinofilních granulocytů v kostní dřeni je hojně stimulována IL-5, IL-3 a GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor). Po vyplavení do periferního oběhu cirkulují v krvi 8 až 18 hodin a tvoří asi 1-3 % bílých krvinek. Jedná se o multifunkční buňky, které modulují vrozené i adaptivní imunitní pochody. Do místa alergického zánětu migrují pod vlivem chemoatraktantů, jako jsou eotaxiny, cytokiny Th2 imunitní odpovědi, chemokiny RANTES a některé adhezivní molekuly. Kromě účasti na alergických procesech, zabezpečují imunitní obranu hostitele při parazitární infekci helminty. (Sastre et al., 2018)

Eozinofily obsahují dva typy granulí, primární a specifická. V nich je uložena celá řada biologicky aktivních molekul, které plní efektorové funkce těchto buněk. Významnou složkou granulí jsou kationtové proteiny, které zahrnují: hlavní bazický protein (MBP), eozinofilní peroxidázu (EPO), eozinofilní kationtový protein (ECP) a neurotoxin odvozený od eozinofilů (EDN). Cytotoxická aktivita MBP je namířena proti parazitům. V souvislosti s astmatem vyvolává bronchokonstrikci a podílí se na poškození epiteliální tkáně. EPO vytváří svou katalytickou aktivitou prozánětlivé

reaktivní produkty, které působí toxicky pro parazitární i hostitelské buňky. ECP i EDN mají ribonukleázovou aktivitu. Cílem působení ECP je řada parazitů, bakterií a RNA virů. EDN má spíše cytotoxické, neurotoxické a antivirové účinky. Další významný protein je Charcot-Leydenův krystalický protein (galektin-10), který je uložený v primárních granulích eozinofilů a uvolňuje se při jejich aktivaci. Tento protein je spojován s eozinofilním zánětem a může poukazovat na alergické nebo parazitární onemocnění. (Sastre et al., 2018)

### **6.2.2.3 Subsety pomocných T lymfocytů**

Imunitní paměť a tolerance jsou zprostředkovány T lymfocyty, které rozpoznávají imunogenní struktury pomocí vysoce variabilního T-buněčného receptoru (TCR). Prekurzory T lymfocytů, které pocházejí z lymfoidní hematopoetické kmenové buňky, opouštějí kostní dřeň a putují do brzlíku. Zde probíhají důležité kroky vývoje T buněk, jako je přeuspořádání genů pro TCR a dále také selekce. Na konci těchto imunogenetických procesů vznikají individuální T lymfocytární klony, které vždy nesou jeden typ funkčních TCR. Takto zralé lymfocyty jsou připraveny na to vycestovat a usídlit se v sekundárních lymfatických orgánech. (Hořejší et al., 2017)

Aktivace a diferenciací T lymfocytů je závislá především na signálech vysílaných okolní tkání, buňkami imunitního systému a také na vnějším prostředí. Kritickou událostí v dalším vývoji podskupin je indukce transkripčních faktorů (TF) specifických pro danou linii. Podstatnou úlohu v imunitní obraně organismu plní pomocné T (Th) lymfocyty. APC předkládají Th lymfocytům antigenní (alergenní) peptidy a současně vysílají kostimulační signály, jež jsou pro aktivování efektorových funkcí Th buněk nezbytné. Podle cytokinového mikroprostředí se naivní CD4<sup>+</sup> lymfocyty dále vyvíjejí v subtypy: Th1, Th2, Th9, Th17 a Th22 (viz Obrázek 1). (Schmidt-Weber, 2014) Mezi Th lymfocyty řadíme i skupinu folikulárních pomocných T lymfocytů (Tfh). Na Tfh lymfocytech závisí vývoj a správné fungování germinálních center (GC) v B-buněčné zóně lymfoidních folikulů uzlin a sleziny. Během reakcí v GC kooperují Tfh s B lymfocyty na tvorbě specifické protilátkové odpovědi. Klíčovou roli v regulaci imunitních procesů zastávají zase T regulační lymfocyty (Treg). Společně se všechny tyto skupiny buněk

podílejí na modulaci adaptivních a částečně i vrozených imunitních mechanismů. (Hořejší et al., 2017)

Přesmyk do Th1 subsetu je spouštěn především prostřednictvím IL-12. Th1 buňky exprimují své prozánětlivé cytokiny, jako je: IL-2, IFN $\gamma$  (interferon gama) a TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alfa). Těmito cytokiny stimulují buněčnou imunitu, kde aktivují makrofágy, cytotoxické T lymfocyty (Tc) a NK buňky (natural killer). (Absolonová et al., 2021; Krejsek et al., 2016) *„Interferon  $\gamma$  produkovaný Th1 T lymfocyty ovlivňuje rovněž B lymfocyty v jejich maturaci a diferenciaci. Je schopen nastavit izotypový přesmyk B lymfocytů na syntézu protilátek třídy IgG, které zpětně po vazbě na bakteriální buňky a virové částice je mohou opsonizovat a zprostředkovat jejich fagocytózu přes Fc receptory, případně aktivovat komplementový systém.“* (Krejsek et al., 2016, s. 115)

Th2 lymfocyty se účastní obrany proti mnohobuněčným parazitům a za patologických podmínek mohou za indukci alergických onemocnění. Pro diferenciaci do subsetu Th2 jsou klíčové cytokiny IL-2 a IL-4. Vlivem IL-4 dochází k aktivaci transkripčních faktorů STAT-6 a GATA-3. Buňky Th2 produkují hlavně IL-4, IL5 a IL-13, dále také např. IL-6, IL-9 a IL-10. Těmito cytokiny podporují imunitní odpověď zprostředkovanou protilátkami a stimulují činnost mastocytů, bazofilů a eozinofilů. IL-4 je hlavním mediátorem izotypového přesmyku v B lymfocytech a interleukiny 9 a 13 mimo jiné stimulují produkci hlenu během alergických reakcí. (Zhu et al., 2008) Subsety pomocných lymfocytů Th1 a Th2 působí protichůdně a navzájem se regulují. Svými cytokiny potencují vývoj buněk vlastního fenotypu, a naopak tlumí opačné subpopulace. Převaha subsetu Th1 se uplatňuje u některých autoimunitních onemocnění, kde dochází vlivem cytotoxického působení k poškození vlastních struktur. Naopak alergie a nádorové stavy jsou mnohdy asociovány s převahou fenotypu Th2. (Absolonová et al., 2021)

Nedávno popsanou podskupinou pomocných T lymfocytů jsou buňky Th9. Jejich signaturním cytokinem je IL-9, ale koexprimují také IL-10 a IL-21. Diferenciace subtypu Th9 je iniciována signálními cestami zprostředkovanými hlavně IL-4 a TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta). TF STAT-6 je zodpovědný za expresi většiny genů spojovaných s tímto subtypem. K polarizaci Th0 do Th9 je dále podstatná aktivace IRF4,

GATA-3, PU.1 a dalších TF. Th9 lymfocyty se podílí např. na indukci a patogenezí atopického onemocnění, antiparazitární imunitě a imunopatologických onemocněních střeva. Svými produkty také působí podpůrně v protinádorové imunitě a mohou být tedy žádoucí při léčbě této skupiny onemocnění. (Zhao et al., 2013)

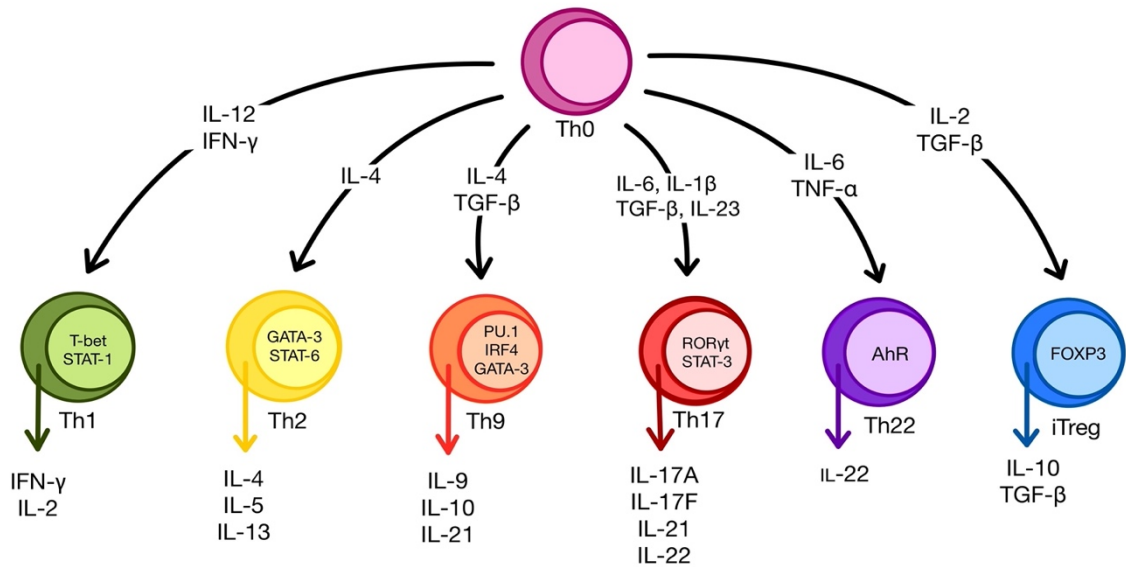
Podskupina lymfocytů Th17 byla pojmenována podle jejich typické produkce IL17A a IL-17F. Kromě toho produkují také IL-6, IL-21, IL-22 a TNF- $\alpha$ . Vývoj line Th17 je ovlivněn přítomností TGF- $\beta$  spolu s IL-6 nebo IL-21, zatímco na udržení fenotypu se podílí IL-23. Tyto cytokiny indukují aktivaci STAT-3, který dále reguluje expresi specifických TF ROR $\gamma$ t a ROR $\alpha$ . Lymfocyty Th17 mají prozánětlivý charakter a svým působením ovlivňují další buňky účastníci se zánětlivého procesu. (Awasthi et al., 2009) „Stimulují B lymfocyty k produkci protilátek (IgG, IgA, IgM, ale ne IgE). Cytokin IL-17 zesiluje expresi chemokinů a prozánětlivých faktorů, podporuje proliferaci, maturaci a migraci neutrofilů a monocytů do místa zánětu, působí kostimulačně na T lymfocyty a zesiluje maturaci dendritických buněk.“ (Absolonová et al., 2021, s. E25) Kromě řízení imunitní reakce při ochraně proti mikrobiálním patogenům, zejména extracelulárním bakteriím a houbám, se dále ukázalo, že jsou spojovány s iniciací a rozvojem autoimunitních onemocnění. Zvýšené frekvence buněk Th 17 a IL-17 byly prokázány u pacientů s revmatoidní artritidou, roztroušenou sklerózou, u zánětlivých onemocnění střev a také např. u pacientů s psoriázou. (Awasthi et al., 2009)

Samostatnou podskupinou pomocných T lymfocytů, která vzniká ve specifickém mikroprostředí IL-6 a TNF- $\alpha$ , jsou Th22 buňky. Tento subtyp byl vymezen na základě vysoké produkce IL-22. V menším množství buňky koexprimují i IL-13 a TNF- $\alpha$ . Profil transkriptomu Th22 je jasně oddělitelný od profilů dalších subtypů. Zahrnuje hlavně geny pro proteiny účastníci se tkáňové remodelace a chemokiny podporující angiogenezi a fibrotizaci tkáně. IL-22 může působit synergicky s dalšími cytokiny, ale většina jeho funkcí je jedinečná. Například stimuluje produkci antimikrobiálních mediátorů, chrání tkáň před poškozením a zvyšuje jejich regeneraci. Cílem IL-22 jsou primárně keratinocyty a epitelální buňky trávicího traktu, jater, plic, pankreatu a dalších orgánů. (Tamasauskiene et al., 2018)

Podstatnou úlohu při řízení adaptivních imunitních reakcí plní heterogenní skupina regulačních T buněk. Treg mají hlavně supresivní a imunoregulační vlastnosti.

Jsou potřebné pro vytváření tolerance k vlastním antigenům a k nepatogenním látkám, dále také k prevenci nadměrných nebo chybných imunitních reakcí. Fenotyp této subpopulace je nejčastěji definován jako  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ . Buňky Treg lze rozdělit na 2 hlavní skupiny: přirozené Treg (nTreg) a indukované Treg (iTreg), které vznikají po antigenní stimulaci ve tkáních. (Delves et al., 2017; Palomares, 2013) nTreg jsou odvozené z thymu, jako výsledek selekčních mechanismů v procesu nastavování centrální tolerance. iTreg jsou indukovány z naivních  $CD4^+$  buněk působením TGF- $\beta$  a IL2 za současné aktivace TF FOXP3. Mezi iTreg řadíme podskupinu Tr1, která je  $FOXP3^-$  a ve velké míře produkuje IL-10. Dále se vymezuje podskupina buněk Th3 produkující hojně TGF- $\beta$ . (Delves et al., 2017; Krejsek et al., 2016) Regulační T lymfocyty vykonávají své supresivní funkce prostřednictvím vícero mechanismů. Molekulární základ suprese spočívá v produkci protizánětlivých cytokinů TGF- $\beta$ , IL-10 a IL-35. Pomocí produkce granzymů a perforinů mohou způsobovat cytolýzu a indukovat tak apoptózu. Dále mohou narušovat metabolismus efektorových buněk (hlavně prostřednictvím exprese CD25) nebo modulovat zrání a funkce dendritických buněk (např. skrze inhibiční molekulu CTLA-4). Podstatnou úlohou Treg je mimo jiné i regulace alergických reakcí. Svým působením mohou např.: potlačovat degranulaci efektorových buněk; inhibovat příliv eozinofilů a dalších buněk do místa zánětu; tlumit aktivaci alergen-specifických Th2 buněk; podporovat produkci IgG4 protilátek a zároveň tlumit tvorbu IgE a v neposlední řadě přispívat k remodelaci tkáně. Selhání těchto regulačních mechanismů může být příčinou rozvoje alergického zánětu. (Palomares, 2013)

**Obrázek 1 Cytokiny a transkripční faktory ovlivňující diferenciaci pomocných T lymfocytů současně s přehledem jejich efektorových produktů**



Zdroj: Krejsek et al., 2016; Zhao et al., 2013 (přepřacováno z textu na obrázek)

**AhR** (Aryl hydrocarbon receptor) – Aryl uhlovodíkový receptor; **FOXP3** – forkhead box protein 3; **GATA-3** (GATA binding protein 3) – GATA vázající protein 3; **IFN- $\gamma$**  – interferon gama; **IL** – interleukin; **IRF4** (interferon regulatory factor 4) – interferonový regulační faktor 4; **iTreg** – indukovaný regulační T lymfocyt; **ROR $\gamma$ t** (retinoid-related orphan receptor gamma t) – gama t receptor souvisejících s retinoidy; **STAT-1 (3, 6)** (signal transducer and activator of transcription 1 (3, 6)) – převodník signálu a aktivátor transkripce 1 (3, 6); **T-bet** (T-box expressed in T cell) – T-box exprimovaný v T buňce; **TGF $\beta$**  (transforming growth factor beta) – transformující růstový faktor beta; **Th** – pomocný T-lymfocyt; **TNF- $\alpha$**  (tumor necrosis factor alfa) – tumor nekrotizující faktor alfa

#### 6.2.2.4 B lymfocyty

B lymfocyty jsou hlavními představiteli specifické humorální imunity a jejich primární funkcí je produkce protilátek. Tvorbou sIgE se podílejí na patogenezi celé řady alergických onemocnění. Mají rovněž velký význam pro imunitní paměť.

Jejich diferenciaci probíhá v kostní dřeni a dokončuje se po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. Na počátku stojí progenitorová buňka, v níž dochází k rekombinačním procesům, které vedou ke vzniku velkého množství klonů B lymfocytů s individuálně specifickými B-buněčnými receptory (BCR). Těmito klonálně odlišnými imunoglobulinovými receptory rozpoznávají B lymfocyty specifické antigenní epitopy. Kromě BCR exprimují B lymfocyty v průběhu jednotlivých diferenciačních stádií charakteristické membránové a nitrobuněčné molekuly, díky nimž je možné buňky rozpoznat. Velmi brzy se objevuje charakteristický znak CD-19, později přibývají i další povrchové antigeny, jako např. CD-10, CD-20, CD38 a CD40. (Krejsek et al., 2016)

Nezralé B lymfocyty podléhají v kostní dřeni procesům selekce. Těmito procesy jsou odstraněny autoreaktivní klony a přežívají jen ty buňky, které nesou funkční BCR. Zralé B lymfocyty s BCR tvořenými molekulami IgM (některé i třídou IgD), putují do sekundárních lymfatických orgánů, kde se setkávají s antigeny. V důsledku antigenní stimulace se buňky množí a diferencují do stádia plazmatických buněk. V této fázi dokáže buňka produkovat velké množství protilátek stejné specifity jako BCR na původním B lymfocytu. Ještě před přeměnou v plazmatické buňky mohou zaktivované lymfocyty prostřednictvím somatické mutace zvýšit svoji afinitu BCR receptoru a posléze tak i protilátek k původnímu antigenu. Proces somatické mutace probíhá pod kontrolou T<sub>fh</sub> v germinálních centrech.

Běžně se jako první po setkání s antigenem tvoří protilátky typu IgM. Produkce protilátek ostatních tříd je závislá na aktuálním okolním prostředí a potřebě imunitního systému. Dochází k ní vlivem přeskupení genů pomocí tzv. izotypového přesmyku. Podstatou tohoto děje je záměna konstantní (constant – C) oblasti imunoglobulinu, a tedy změna typu těžkého řetězce. Protilátky ostatních izotypů (různé podtřídy IgG, IgE, IgA) si tak zachovávají antigenní specifitu, ale navíc mají jiné efektorové vlastnosti. (Krejsek et al., 2016) Hlavní regulační funkci v izotypovém přepnutí zaujímají cytokiny a kostimulační signály poskytované Th lymfocyty. Významná je hlavně interakce mezi molekulou CD40 na B lymfocytu a ligandu CD40L na Th lymfocytu. Tato signalizace spolu se specifickým cytokinovým prostředím stimuluje produkci určitého izotypu protilátek. Příkladem mohou být buňky Th2 produkující IL-4, který směřuje přesmyk

do tříd IgE a IgG1. Naopak subpopulace Th1 svou produkcí IFN- $\gamma$  tento přesmyk inhibuje. (HE et al., 2015)

V konečné fázi diferenciaci vznikají plazmatické buňky produkující vysokoafinní protilátky. Současně část buněk přechází v buňky paměťové. V případě opakovaného setkání s antigenem se rychle aktivují, množí a zahajují produkci specifických protilátek. (Krejsek et al., 2016)

### 6.2.3 Protilátková odpověď

Protilátky (Imunoglobuliny) jsou hlavní humorální složkou specifické imunity. Obecně je protilátková reakce založena na rozpoznání potencionálního antigenu specifickými BCR, což za daných předpokladů vede ke stimulaci B lymfocytů, které po diferenciaci na plazmatické buňky produkují velkým množstvím antigenně-specifických protilátek. Jejich forma může být sekretovaná (solubilní) nebo membránově vázaná, kde je imunoglobulin v podobě BCR. (Hořejší et al., 2017)

Imunoglobuliny jsou látky glykoproteinové povahy, jejichž základní molekula je složena ze dvou lehkých a dvou těžkých polypeptidových řetězců, které navzájem pojí disulfidické můstky. Z hlediska variability se imunoglobulin dá rozdělit na variabilní a konstantní část. Variabilní oblast je místo vazby antigenu a liší se dle specifického klonu B lymfocytu. Větší část molekuly představuje poměrně málo variabilní konstantní oblast, která je stejná pro protilátky jedné třídy. Imunoglobuliny můžeme rozdělit do 5 tříd: IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. (Hořejší et al., 2017) *„Příslušnost k určité třídě imunoglobulinů vychází z typu těžkého řetězce. Konstantní části těžkých řetězců určují svým složením imunobiologické vlastnosti jednotlivých tříd protilátek. Rozdíly jsou především v aminokyselinovém složení, v počtu a umístění meziřetězcových disulfidických můstků, v počtu domén a v úrovni glykosylace řetězců.“* (Krejsek et al., 2016 str.132)



### 6.2.3.1 IgE protilátky

Fyziologicky se imunoglobuliny E podílejí na imunitní obraně proti parazitárním infekcím. Kromě toho jsou úzce spojovány s hypersenzitivitou I. typu, která se manifestuje v podobě alergických onemocnění. IgE se vyskytují výhradně v monomerní podobě s molekulovou hmotností 190 kDa. (Stone et al., 2010) Jejich molekula má podobně jako ostatní imunoglobuliny základní čtyřřetězcovou strukturu spojenou disulfidickými můstky. Ve srovnání s třídou IgG se architektura IgE liší počtem domén těžkých řetězců, kde se nachází navíc jeden pár konstantních domén, a také nepřítomností pantové oblasti. Studium krystalové struktury protilátky byly odhaleny konformační změny IgE po vazbě na FcεRI, při kterých dochází k ohnutí konstantního doménového páru Cε2 a vzniku asymetrické trojrozměrné struktury. To může být základem výjimečně pomalé rychlosti disociace komplexu IgE-FcεRI a tím i schopnosti IgE způsobit přetrvávající alergickou senzibilizaci žírných buněk. (Sutton et al., 2019)

Sérová koncentrace protilátek IgE je o několik řádů nižší než koncentrace IgG nebo IgA, protože syntéza IgE je přísně kontrolována na molekulární a buněčné úrovni. Navíc je jejich biologický poločas krátký: 1–5 dní. (Stone et al., 2010) Koncentrace v séru se u nealergických jedinců pohybuje v rozmezí 50–200 µg/L, avšak u alergiků jsou tyto hladiny daleko vyšší. Narozdíl od jiných izotypů se IgE vyskytují převážně ve tkáních, kde jsou silně vázány zejména na žírné buňky a bazofily. Dále se mohou pomocí svých receptorů vázat na další řadu buněk imunitního systému. Z této podstaty vyplývá patogeneze IgE, kde dojde vlivem vazby alergenu k zesíťování komplexů IgE-FcεRI na povrchu efektorových buněk, a tak k uvolnění prozánětlivých mediátorů. (Dullaers et al., 2012)

K izotypovému přesmyku na třídu IgE jsou potřeba dva signály. Počáteční signál je zprostředkován IL-4 nebo IL-13, prostřednictvím interakce s příslušnými receptory na B lymfocytech. Transdukce signálu pokračuje až na úroveň transkripce prostřednictvím TF STAT-6, jež aktivuje přepis v přepínací (switch – S) oblasti specifické pro izotyp IgE (Sε). Dalším signálem je propojení molekuly CD40 s ligandem CD40L. Tato interakce postupně vede k jaderné translokaci TF NFκB, který působí synergicky se STAT-6. V konečném stádiu přepínání izotypu je deletován úsek DNA

mezi oblastí S $\mu$  a S $\epsilon$ , což vede k syntéze těžkého řetězce molekuly IgE protilátky. (HE et al., 2015)

Na molekulární úrovni může k přesmyku na izotyp IgE dojít dvěma způsoby: přímou rekombinací mezi S oblastmi genů pro C $\mu$  a C $\epsilon$  nebo dvoustupňovým sekvenčním přepnutím, při kterém B lymfocyty projdou nejprve rekombinací na IgG. Přímý přechod izotypu je spojen s vývojem méně pozměněných protilátek, které mají zároveň nižší afinitu k příslušnému antigenu. Naproti tomu sekvenční přepínání vede k produkci vysokoafinních protilátek, protože variabilní část protilátky dědí somatické mutace a vysokou afinitu k antigenu již z předchozí fáze IgG. (HE et al., 2015)

### **6.2.3.2 IgG protilátky a jejich podtřídy**

Imunoglobuliny G (IgG) jsou nejhojněji se vyskytující třídou protilátek v lidském organismu. Koncentrace v plazmě dospělých se pohybuje v rozmezí 7–9 g/L. Jako jediné jsou IgG schopné přestupovat placentou a chránit novorozence do 3.–6. měsíce života, než nastane jejich vlastní produkce. (Krejsek et al., 2016) IgG se vyskytují v podobě monomeru, jejichž obecný tvar je popisován jako písmeno „Y“, kde jsou dvě ramena Fab připojena k Fc části pantovou oblastí. Molekulová hmotnost IgG se pohybuje okolo 150 kDa (u podtřídy IgG3 170 kDa). Podobně jako další třídy protilátek se v monomerním tvaru skládají ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců, přičemž každý těžký řetězec obsahuje tři konstantní domény a jednu variabilní. Celkově má tato třída široké uplatnění v imunitní obraně organismu, kde se využívá mechanismů, jako jsou např.: opsonizace; aktivace komplementu; aglutinace a neutralizace antigenu; navození na protilátkách závislé cytotoxické reakce NK buněk. Třídu IgG můžeme rozdělit na čtyři podtřídy s více než 90 % homologií v aminokyselinové sekvenci. Největší rozdíly jsou pozorovány v povaze a délce pantové oblasti. Znalost existence jednotlivých podtříd IgG je zásadní, protože se mezi nimi objevují výrazné rozdíly ve schopnosti aktivovat efektorové funkce. (Delves et al., 2017)

**Tabulka 2 Relativní zastoupení podtříd IgG a jejich biologické vlastnosti**

Podtřída	Relativní zastoupení [%]	Placentární přenos	Aktivace komplementu	Interakce s FcγR
IgG1	60	vysoký	vysoká	FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa, b; slabě s FcγRIIb/c
IgG2	32	nízký	střední	méně s FcγRIIa, slabě s FcγRIIIa
IgG3	4	vysoký	nejvyšší	FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa, b; slabě s FcγRIIb/c
IgG4	4	ano	ne	méně s FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa; slabě s FcγRIIb/c

Zdroj: Vidarsson et al., 2014 (upraveno a přeloženo)

**Ig** – imunoglobulin, **FcγR** – receptory pro IgG protilátky

Protilátky podtřídy IgG1 zprostředkovávají reakci hlavně na rozpustné či membránové proteinové antigeny. Za fyziologických podmínek jsou IgG1 nejhojnější podtřídou. Jejich nedostatek se může projevit jako snížení celkové hladiny IgG, tzv. hypogamaglobulinémie. V kombinaci s nedostatkem dalších podtříd, je snížení IgG1 spojeno s recidivujícími infekcemi. Z hlediska struktury má podtřída IgG1 v oblasti pantu 15 aminokyselin (AK) a spojení těžkých řetězců zajišťují dva disulfidické můstky, což propůjčuje molekule značnou flexibilitu. (Vidarsson et al., 2014)

Odpověď podtřídy IgG2 vyvolávají primárně bakteriální kapsulární polysacharidové antigeny. Deficit této podtřídy se projevuje zvýšenou náchylností k některým bakteriálním infekcím. Sníženou hladinu IgG2 mohou kompenzovat zvýšené hladiny podtříd IgG1 a IgG3, které za normálních okolností zajišťují obranu i proti glykanům konjugovaným s proteiny. Na rozdíl od ostatních podtříd mají IgG2 nejkratší pant, který obsahuje pouze 12 AK. Spojení těžkých řetězců v pantu zajišťují, až na některé izomerní výjimky, čtyři disulfidické můstky, jež omezují celkovou flexibilitu molekuly. (Vidarsson et al., 2014)

Protilátky IgG3 mají silný prozánětlivý efekt. Jejich biologický poločas je kratší, než u ostatních podtříd, kde se běžně pohybuje okolo 21 dní. Vzhledem k tomu, že se jedná o silně prozánětlivou protilátku, může její kratší poločas rozpadu sloužit ke snížení pravděpodobnosti nadměrných zánětlivých reakcí. Obecně jsou protilátky IgG1 a IgG3 vytvářeny v reakci na virové infekce, přičemž protilátky IgG3 se projevují hlavně na počátku infekce. IgG3 má mnohem delší pantovou oblast než ostatní podtřídy, protože obsahuje až 62 AK a 11 disulfidických můstků. (Vidarsson et al., 2014)

Protilátky podtřídy IgG4 mohou nabývat převahy po opakovaném nebo dlouhodobém vystavení antigenu v neinfekčním prostředí. Kromě IgE vyvolávají alergeny často také odpověď IgG1 a IgG4. Zvýšené titry specifických IgG4 je možné pozorovat u alergických pacientů po absolvování imunoterapie. Jejich vyšší koncentrace se dále objevují např. při reakcích na terapeutické proteiny a rekombinantní protilátky nebo při infekcích helminty a vláknitými parazity. Rovněž se vymezuje skupina tzv. onemocnění asociovaných s IgG4, která je charakteristická zvýšenou hladinou IgG4 v séru a poškozením tkání infiltrovanými IgG4-pozitivními plazmatickými buňkami. Jedná se o širokou škálu poruch, kam se řadí např.: autoimunitní pankreatitida, Mikuliczův syndrom, Riedelova tyreoiditida, retroperitoneální fibróza, neinfekční aortitida a další. (Vidarsson et al., 2014)

Imunoglobuliny G 4. podtřídy jsou do jisté míry podobné podtřídě IgG2, kde se v pantu nachází shodný počet AK. Dalším rysem jejich podobnosti je tvorba strukturních izomerů. Mezi lidskými IgG4 může však docházet k fenoménu, kdy se jedna polovina molekuly nahradí jinou polovinou klonu IgG4. Děje se tak na základě narušených kovalentních vazeb disulfidických můstků v pantové oblasti. Z monospecifických protilátek vznikají bispecifické, které mají nižší aviditu, omezenou schopnost tvořit imunitní komplexy a aktivovat komplement. IgG4 vykazují slabší vazbu na většinu aktivačních receptorů. Naopak mají ze všech podtříd nejvyšší afinitu k inhibičnímu receptoru FcγRIIb, což pravděpodobně přispívá k jejich protizánětlivým účinkům. U protilátek IgG4 se také můžeme setkat s pojmenováním „blokující protilátky“, a to hlavně ve spojitosti s alergiemi, kde IgG4 soutěží s IgE o vazbu alergenu. (Vidarsson et al., 2014)

## 6.2.4 Respirační formy alergického zánětu

Alergický zánět se klinicky manifestuje jako alergické onemocnění, které se může projevit v každém věku a v různé podobě. Alergická rýma a bronchiální astma patří mezi respirační formy alergického zánětu. Do skupiny hlavních alergických onemocnění se dále řadí atopická dermatitida, kopřivka, anafylaxe nebo potravinová alergie. (Hořejší et al., 2017)

### 6.2.4.1 Alergická rhinitida

Prevalence alergické rhinitidy nebo také rýmy v posledních desetiletích výrazně stoupá. V současné době je jí postiženo přibližně 15 až 30 % populace. Onemocnění je definováno jako IgE-mediovaný zánět nosní sliznice, který vzniká u predisponovaného jedince po kontaktu s alergenem. Takto navozený dlouhodobý eozinofilní zánět nosní sliznice je spojen s typickými klinickými příznaky, jako je svědění nosu, kýchání, vodnatá sekrece, otok a ucpaní nosu. (Krčmová et al., 2018) *„Až 60–70 % pacientů s alergickou rýmou (zejména s vazbou na pyl) má i projevy oční: alergickou konjunktivitidu. Alergický proces zahrnuje i další příznaky či komorbiditu. Patří k nim bolesti hlavy, nespavost, chrápání, snížená výkonnost a poruchy koncentrace. Klinický obraz alergické rýmy bývá sdružen s projevy sinusitidy, otitidy, nosní polypózy či bronchiálního astmatu. Na podkladě zkřížené reaktivity některých druhů pylů s určitými alergeny ovoce, zeleniny či druhů koření může mít pacient tzv. orální alergický syndrom či další projevy potravinové alergie“* (Krčmová et al., 2018 s.75)

V současné době se rozlišuje více typů alergické rýmy na základě trvání a tíže alergických symptomů. Z hlediska délky trvání ji můžeme klasifikovat jako intermitentní či perzistující a dále ji rozdělit dle intenzity příznaků na mírnou, střední a silnou. Toto dělení alergické rýmy následně pomáhá zvolit i adekvátní terapii, ve které se uplatňuje stupňovitý přístup. V praxi se také stále využívá klasifikace, která vychází z období obtíží, tj. rozdělení na sezónní a celoroční. (Krčmová et al., 2018)

Při medikamentózní terapii alergické rýmy se uplatňují léky úlevové a preventivní. K úlevě od alergických symptomů jsou hojně užívané místní či celková antihistaminika. Při prevenci intermitentní rýmy je možné přidat k léčbě antihistaminiky i nazální kortikosteroidy. U perzistujících forem rýmy jsou

však kortikosteroidy lékem první volby. Dále se při terapii využívají např. kromony, antileukotrieny nebo také kauzální léčba, kterou je specifická alergenová imunoterapie. (Krčmová et al., 2013)

#### **6.2.4.2 Astma bronchiale**

Průduškové astma je epidemiologicky značně rozšířené chronické onemocnění, jehož prevalence v populaci převyšuje 5 %. Onemocnění se vyskytuje ve všech věkových kategoriích, přičemž jsou pacienti často postiženi během svých nejproduktivnějších let. (Virchow, 2013) Astma je definováno jako chronické zánětlivé onemocnění plic, jež vede k rozsáhlému omezení průchodu dýchacích cest se vznikem obtíží jako jsou dušnost, sípání, kašel, tlak na hrudi a další. Typický je epizodický výskyt obtíží s cirkadiálním vrcholem příznaků v brzkých ranních hodinách. Obstrukce bronchů často není trvalá, buď samovolně odejde nebo je možné ji zvrátit pomocí léků. Dlouhodobý zánět mnohdy vede až k remodelaci plicní tkáně, při které dochází k jizvení dýchacích cest, a tak k většímu omezení proudění vzduchu. (Krčmová et al., 2013; Virchow, 2013)

Na bázi klinických a laboratorních poznatků byly navrženy odlišné fenotypy astmatu. Ve většině případů se jedná o alergické astma, kde se zánět rozvíjí na podkladě IgE protilátek s přecitlivělostí na inhalační alergeny. Na druhou stranu astma, které se rozvíjí na jiném než alergickém podkladě, je označováno jako vnitřní. Astma je také možné klasifikovat do čtyř stupňů dle tíže projevů na intermitentní, lehké perzistující, středně těžké až těžké perzistující. Dále se při klasifikaci používá hodnocení kontroly nad chorobou. (Krčmová et al., 2013)

Léčba astmatu má za cíl dostat a udržet stav onemocnění pod kontrolu. Převážná část pacientů má při inhalační léčbě minimální nebo žádné negativní účinky. Inhalační kortikosteroidy jsou pro jejich protizánětlivý účinek lékem volby u perzistujícího astmatu. Naopak aplikace inhalačních  $\beta_2$ -agonistů má obvykle pozitivní vliv na akutní astmatické potíže. Mnoho jedinců s těžším astmatem nebo těch, kteří nedodržují léčebný plán, má však nadále nekontrolované příznaky. V rámci volby léčby se uplatňuje stupňovitý charakter, kde se v nejvyšším stupni využívá další léčebná metoda a tou je biologická léčba anti-IgE protilátkami. Terapie je určena pro léčbu

těžkého perzistujícího alergického astmatu, u kterého není možné dosáhnout kontroly nad chorobou pomocí běžné medikamentózní léčby. Další možností léčby alergického astmatu může být alergenová imunoterapie, která se provádí u dlouhodobě kontrolovaných astmatiků, u nichž je znám příčinný alergen a nejsou polysenzibilizováni. (Krčmová et al., 2013; Virchow, 2013)

### **6.2.5 Specifická alergenová imunoterapie**

Specifická alergenová imunoterapie (SAIT), dříve označovaná jako desenzibilizace nebo hyposenzibilizace, je kauzální léčba, která přímo cílí na příčinu alergického onemocnění. SAIT tvoří společně s eliminací příčinného alergenu a farmakoterapií základ léčby alergických onemocnění. Jedná se o druh imunomodulace, při níž se vytváří tolerance k alergenu. Celkově dochází k redukci alergického zánětu a následně i příznaků alergie. SAIT tedy snižuje závažnost onemocnění, spotřebu léků a také minimalizuje rizika nové senzibilizace. (Alvaro-Lozano et al., 2020)

#### **6.2.5.1 Princip**

Specifická alergenová imunoterapie je léčebný postup, jenž pracuje na principu pravidelného podávání malého množství konkrétního alergenu pacientovi, za účelem snížení imunitní reaktivity organismu na daný alergen a zvýšení počtu Treg buněk, které se podílejí na indukci a udržování dlouhodobé imunitní tolerance. (Frew, 2010) V úvodu terapie se alergen (případně jejich směs) podává v postupně se zvyšujících dávkách, poté jsou v rámci udržovací léčby opakovaně podávány nejvyšší možné dávky. Celkově tato léčba probíhá přibližně 3 až 5 let a u většiny pacientů se kombinuje s konvenční farmakoterapií. (Bystroň, 2012)

Imunoterapie prospívá jak pacientům s mírným alergickým onemocněním, tak těm, kteří nereagují dobře na běžnou symptomatickou léčbu. SAIT je léčbou volby pro pacienty se systémovými reakcemi na jed blanokřídlého hmyzu, ale využívá se také u pacientů s alergickou rýmou či astmatem. Přínos léčby může být ovlivněn mnoha faktory, jako např.: správná diagnóza; typ a tíže onemocnění; zdravotní stav pacienta; druh hlavního alergenu a také to, zda má pacient kosenzibilizace. (Frew, 2010)

### **6.2.5.2 Alergeny používané v SAIT**

Běžně jsou pro terapeutické (ale i diagnostické) účely využívány extrakty z přírodních alergenních zdrojů. V současné době se klade velký důraz na jejich standardizaci, jež má zabezpečit definovanou kvalitu a účinnost alergenů. Výrobcům se doporučuje, aby se vakcíny standardizovaly na celkovou alergenní účinnost nebo tzv. biologickou aktivitu a aby koncentrace hlavního alergenu byla vyjádřena v hmotnostních jednotkách ( $\mu\text{g/mL}$ ). (Bystroň, 2012) Pokrokovým přístupem ke standardizaci je výroba rekombinantních alergenů. Vzhledem k tomu, že je lze vyrábět v neomezeném množství s přesnými fyzikálně-chemickými a imunologickými vlastnostmi, jsou rekombinantní alergeny velmi dobrou alternativou v budoucí léčbě alergií. (Makatsori et al., 2013)

### **6.2.5.3 Imunobiologický mechanismus účinku SAIT**

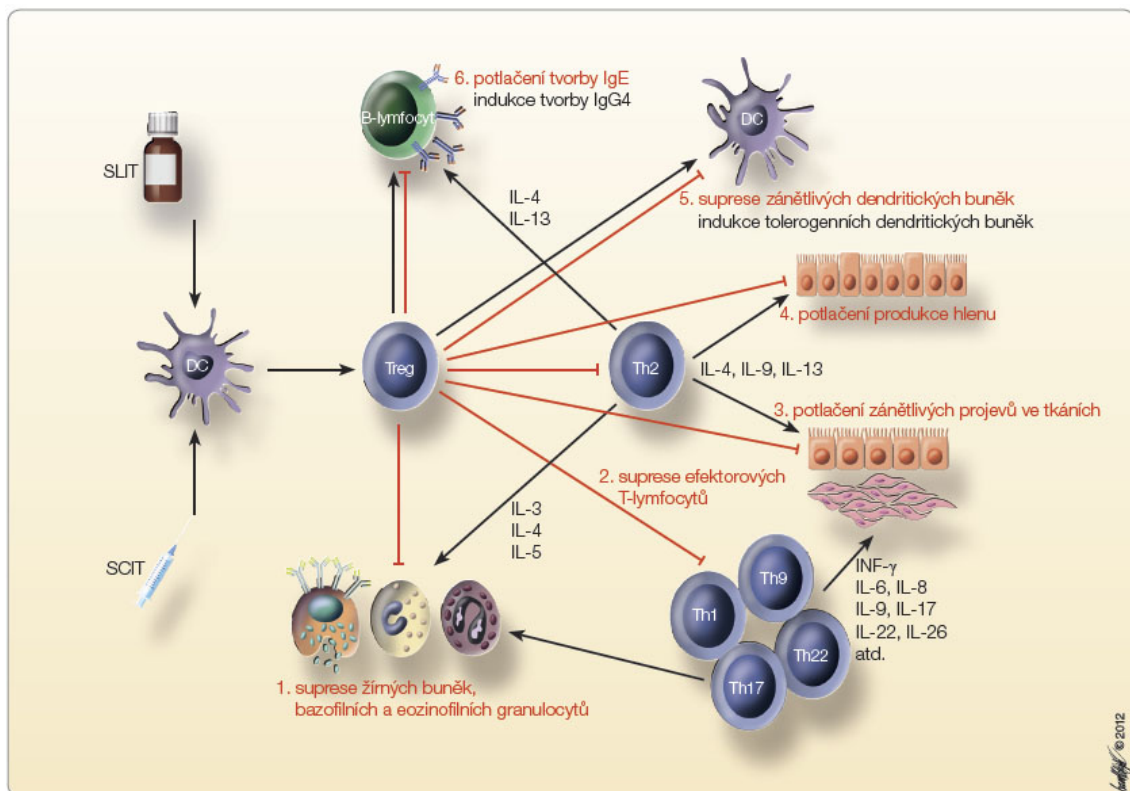
I když jsou přesné mechanismy působení alergenové imunoterapie stále předmětem výzkumů, existuje řada klinických důkazů o jejich pozitivních účincích na celkový pochod alergické reakce. Předpokládá se, že v průběhu úspěšné imunoterapie dochází k zásahu do dysbalance Th1 a Th2 lymfocytů. Existují důkazy o tom, že je vlivem léčby potlačena nadměrná činnost subsetu Th2 a zároveň stimulována aktivita Th1 lymfocytů. Ve spojitosti s tímto přechodem nastávají změny v cytokinové síti, kde je snížena sekrece IL-4, IL-5 a IL-13. Nižší množství těchto proalergenních interleukinů se projeví poklesem produkce sIgE, což je při SAIT žádoucí. (Alvaro-Lozano et al., 2020) Paradoxně se na počátku terapie hladiny přechodě zvyšují, avšak po několika měsících nastává jejich pokles. Na druhou stranu je při SAIT podporována tvorba IL-2, IFN- $\gamma$  a TNF $\alpha$ , jejichž působením je protilátková odpověď směřována do podtřídy IgG4. Změny v těchto mechanismech zahrnují i snížení aktivace, tkáňové migrace a degranulace efektorových buněk. (Alvaro-Lozano et al., 2020; Jutel, 2014)

Dalším důležitým mechanismem SAIT je indukce regulačních T buněk, které svými produkty efektivně tlumí alergický zánět. Prostřednictvím jejich produktů jsou regulovány funkce řady buněk imunitního systému včetně těch, které prezentují



antigen. Treg produkují IL-10 a TGF- $\beta$ , ale také využívají k supresi povrchové inhibiční molekuly, jako jsou CTLA4 a PD1. IL-10 snižuje aktivitu eosinofilů přímo nebo inhibicí syntézy IL-5. Dále ovlivňuje přechod na protilátky IgG4, díky čemuž je tato podtřída spojována s poklesem imunologických odpovědí nebo navozením tolerance. Ukazuje se, že se po zahájení specifické imunoterapie zvyšují počty specifických Treg, jež mají negativní vliv na aktivitu a funkci subsetu Th2. (Alvaro-Lozano et al., 2020; Frew, 2010; Jutel, 2014)

**Obrázek 2 Mechanismy působení SAIT**



Zdroj: Bystroň, 2012 (převzato)

**DC** – dendritická buňka, **SLIT** – sublingvální alergenová imunoterapie, **SCIT** – subkutánní alergenová imunoterapie **Ig** – imunoglobulin, **IL** – interleukin, **INF** – interferon, **Th** – pomocný T-lymfocyt, **Treg** – regulační T-lymfocyt

#### 6.2.5.4 Formy provedení SAIT

V současné době jsou uznávané dva přístupy v podávání alergenové imunoterapie. Jednou možností je aplikace alergenu v podobě injekcí nebo tzv. subkutánní formě (SCIT). Účinnost SCIT je v současnosti přesvědčivě

prokazována laboratorními výsledky. Byl potvrzen i její klinický efekt, a to hlavně i po ukončení terapie. K léčbě se nejčastěji využívají depotní extrakty alergenů, jejichž nabídka na trhu zahrnuje různé inhalační alergeny a hmyzí jedy. Schéma dávkování není fixně stanoveno, je však vhodné se řídit doporučením výrobce konkrétního léčiva. V počáteční fázi aplikace SCIT je možné použít konvenční protokoly, kdy se injekce aplikuje jednou za týden po dobu 3–4 měsíců. Dávky se postupně zvyšují až po dosažení koncentrace doporučené udržovací dávky. V následující fázi se pokračuje s aplikováním bez dalšího navýšování dávky, a to v jednoměsíčních intervalech. Výhodou konvenčních protokolů je minimalizace rizik nežádoucích reakcí, pacient však musí docházet v úvodní fázi na injekci každý týden. Vzhledem k nevýhodě velkého počtu návštěv byly navrženy zrychlené postupy uvádění léčby SCIT. (Bystroň, 2012) *„SCIT celoročně se vyskytujícím alergenem zahajujeme kdykoli během roku. U sezonní alergie je vhodné zahájit léčbu s dostatečným odstupem před počátkem sezony, aby bylo možno dosáhnout udržovací dávky před nástupem alergických obtíží.“* (Rybníček et al., 2021, s. 19) Léčba SCIT je obvykle bezpečná, zejména když je správně aplikována a indikována kvalifikovaným lékařem. I v těchto případech je nutné brát zřetel na možné nežádoucí místní či systémové reakce. (Bystroň, 2012)

Poslední dobou je však vyhledávanější formou sublingvální imunoterapie (SLIT), kde je alergenový extrakt aplikován pod jazyk, a to v podobě kapek nebo tablet. Sublingvální léčba s sebou přináší značné výhody, jako např.: neinjekční způsob podání, vysoká bezpečnost a aplikace bez nutnosti častých návštěv lékaře. Doporučený způsob aplikace se liší dle konkrétního zpracování a výrobce. SLIT je ve většině případů podávána každý den. Léčba může být tedy celoroční nebo se v případě sezonních alergií uplatňuje zkrácené schéma, kdy je alergen aplikován pouze před a během sezony. Z důvodů případných nežádoucích reakcí je první dávka vždy podávána pod dohledem lékaře, v další léčbě může pacient pokračovat sám v domácím prostředí. V porovnání se SCIT je úvodní fáze léčby kratší, dokonce může u některých preparátů zcela chybět. Přestože se zdá, že mechanismus účinku SLIT je obdobný jako u SCIT, kumulativní dávka alergenu musí být v průběhu roční léčby 20–200x vyšší. (Rybníček et al., 2021)

V současnosti jsou na trhu dostupné různé preparáty pro SAIT. Pro subkutánní aplikaci, kde je depotní extrakt ve formě injekce, se užívá např. přípravek Alutard SQ, Pollinex Tree nebo Pollinex Rye. Při SLIT ve formě kapek je dostupný preparát Staloral 300 od výrobce Stallergenes, kde je v roztoku obsažen extrakt z konkrétního druhu pylu nebo je přítomna směs vícero druhů alergenových extraktů. Od stejného výrobce je k dispozici tabletová forma v podobě přípravku Oralair. Tyto tablety obsahují směs alergenových extraktů z pylu 5 druhů trav a jsou určeny k podávání před a během pylové sezóny po dobu 6 měsíců. Mezi další tabletové přípravky se řadí např. Grazax, který obsahuje extrakt travního pylu z bojínku. Pokud jsou na trhu dostupné obě možnosti SAIT, měla by vybraná forma odrážet kompromis mezi preferencemi pacienta a lékařovým doporučením. Oba druhy imunoterapie jsou prospěšné při léčbě sezónní či celoroční alergické rýmy u dospělých i dětí, a to i přesto, že několik dřívějších přehledů systematických studií argumentovalo vyšší účinností SCIT ve srovnání se SLIT při léčbě dýchacích projevů alergie. (Rybníček et al., 2021)

#### **6.2.5.5 Indikace SAIT**

Léčba pomocí SAIT je uplatňována v případech, kdy se u jedince vyskytují klinické projevy alergického onemocnění. Před rozhodnutím použití SAIT je třeba pečlivě posoudit zdravotní stav pacienta a také věnovat pozornost spouštěčům alergie. Vzhledem k tomu, že se jedná o léčbu finančně i časově náročnou, je nutné zhodnotit možná rizika a náklady v porovnání s konvenční farmakoterapií. (Rybníček et al., 2021)

O alergenové imunoterapii je možné uvažovat u nemocných od 5 let, ve výjimečných případech od 3 let věku. Horní věkový limit je 65 let, ale ani ten není nutné striktně dodržet, obzvláště pokud se jedná o seniory s alergií na jed blanokřídlých. (Bystroň, 2012) Z hlediska tíže onemocnění je SAIT doporučována nemocným se symptomy středně těžké až těžké míry, ale je možné ji využít i u pacientů s méně závažnými příznaky či za účelem předcházení astmatu. Vždy je nutné určit souvislost mezi senzibilizací k danému alergenu (či skupině podobných alergenů) a klinickými symptomy. Přecitlivělost I. typu je potřeba jednoznačně potvrdit kožními testy a/nebo vyšetřením sIgE. K vyšší účinnosti a ke správné indikaci SAIT

(např. u polysenzibilizovaných jedinců) přispívá i molekulární komponentová diagnostika, díky které lze snáze odlišit klinicky relevantní skutečnou senzibilizaci od zkřížené reaktivity. (Alvaro-Lozano et al., 2020).

Alergenová imunoterapie se také doporučuje v případě, že alergen nelze úspěšně odstranit z okolí pacienta nebo pokud je reakce pacienta na běžnou farmakoterapii nedostatečná či ji odmítá. Při indikaci je zásadní dostupnost standardizované alergenové vakcíny, případně jiné kvalitní vakcíny s jasně prokázanou účinností. Pacient musí být před začátkem léčby seznámen se zásadami a riziky SAIT, ale také je potřeba, aby souhlasil s podmínkou dlouhodobé spolupráce, a to i té finanční. (Bystroň, 2012)

#### **6.2.5.6 Kontraindikace SAIT**

Před zahájením SAIT je nutné vyloučit situace, kdy je podání alergenového extraktu z bezpečnostních důvodů nevhodné. Za absolutní kontraindikaci je možné považovat přítomnost maligního onemocnění, aktivní formy autoimunitní poruchy či jiného závažného imunopatologického stavu. Nevhodnými kandidáty pro SAIT jsou pacienti, kteří trpí silným či špatně kontrolovaným astmatem. Zahájení alergenové imunoterapie v průběhu těhotenství je absolutně kontraindikováno. Pokud je žena léčena SAIT a otěhotní v jejím průběhu, je možné v léčbě při dobré toleranci pokračovat, nicméně je potřeba dbát zvýšené opatrnosti. (Pitsios et al., 2015; Rybníček et al., 2021)

Další kontraindikace jsou spíše relativní, proto se v jednotlivých případech volí individuální přístup. Léčba s relativní kontraindikací připadá v úvahu, pokud předpokládaný přínos převáží nad rizikem zhoršení stavu pacienta. SAIT může být potenciálně nežádoucí u pacientů s jiným vážným onemocněním, ke kterým řadíme např. i chronické infekce, psychické poruchy nebo kardiovaskulární, jaterní a renální choroby. U pacientů léčených  $\beta$ -blokátory je doporučeno, aby před zahájením SAIT přešli na alternativní druh léčby. Podle některých doporučení je současné užívání imunosupresiv kontraindikací, protože mohou významně snížit účinnost SAIT. (Pitsios et al., 2015)

### **6.2.5.7 Hodnocení účinku SAIT**

Pro posuzování klinického účinku je k dispozici řada nástrojů, jež vycházejí z klinických zkušeností, pacientova subjektivního posouzení léčby, ale také z hodnocení pomocí objektivních nástrojů. Při hodnocení údajů z randomizovaných kontrolovaných studií byla v různých metaanalýzách potvrzena klinická účinnost a bezpečnost alergenové imunoterapie. Primárním klinickým cílem v prováděných studiích bylo snížení alergických příznaků a z toho plynoucí nižší potřeba antialergické medikace. Skóre kvality života a dny bez příznaků byly zase považovány za sekundární koncové body. (Pitsios., 2021)

Nejběžněji se k hodnocení účinnosti pro závažnost příznaků používá průměrné celkové skóre příznaků rinokonjunktivitidy (RCSS). Tento skórovací systém je obvykle postaven na denním hodnocení 6 příznaků rýmy a konjunktivitidy. Každý příznak je hodnocen na škále 0–3, přičemž maximální skóre je stanoveno na 18 bodů. Pro homogenizaci terminologie se často využívá přepočítání na denní skóre symptomů (dSS), u kterého se celkový počet bodů dělí počtem příznaků (rozsah skóre dSS je tedy 0–3). (Pitsios., 2021)

Způsob měření klinických výsledků pomocí kombinovaného skóre symptomů a medikace (CSMS) se zdá být pro hodnocení klinické účinnosti nejvhodnější. Standardizované CSMS odpovídá doporučením Evropské lékové agentury (EMA). Skóre je založeno na stejné váze denního skóre symptomů jako denního skóre medikace (dMS), přičemž rozsah dMS je stejný jako u dSS. CSMS je součtem těchto dvou denních skóre, proto se jeho hodnoty pohybují v rozmezí 0–6. (Pitsios., 2021)

V rámci klinických studií jsou také využívány různé druhy dotazníků, které nejčastěji hodnotí buď symptomy, nebo celkovou kvalitu života s alergickou rýmou a/nebo astmatem. Možnou nevýhodou těchto dlouhých dotazníků je, že jejich vyplnění zabere více času. Dalším užitečným nástrojem, vhodným zvláště pro klinickou praxi, je vizuální analogová škála (VAS). Tento rychlý a snadno aplikovatelný nástroj se používá k subjektivnímu hodnocení klinických příznaků pacientem. Nejpoužívanější model VAS spočívá v tom, že pacient na 10cm vertikální stupnici vyznačí svislou čáru nejlépe odrážející úroveň jeho příznaků, od 0 (žádné příznaky) po 10 (nejvyšší úroveň

příznaků), podle toho, jak jsou příznaky závažné. Na škále je možné hodnotit jak celkové potíže způsobené onemocněním, tak jednotlivé příznaky zvlášť. (Pitsios., 2021)

V současné době neexistují žádné široce používané, důvěryhodné in vitro biomarkery, které by přesně odrážely klinické důsledky alergenové imunoterapie, přestože by jejich použití bylo více objektivní a celkově snáze proveditelné. (Pitsios, 2021) Pracovní tým Evropské akademie pro alergii a klinickou imunologii (EAACI) navrhl a přezkoumal sedm oblastí možných biomarkerů in vitro a in vivo, které souvisejí s humorálními a buněčnými účinky SAIT. Mezi potenciální humorální biomarkery in vitro byly zařazeny: sIgE, celkové IgE a jejich poměr; podtřídy IgG (zejména specifické IgG4) a také stanovení sérové inhibiční aktivity pro IgE, jež zahrnuje vyšetření IgE-blokujícího faktoru (IgE-BF) nebo test vazby alergenu usnadněný IgE (IgE-FAB). (Shamji et al., 2017)

Podtřída protilátek IgG4 byla mezi možné biomarkery úspěšné léčby zařazena pro svou povahu a blokující funkci. I přestože studium SAIT v mnoha případech ukázalo postupný nárůst sIgG4 v průběhu terapie, nebylo zatím prokázáno, že by jejich celkové hladiny korelovaly s klinickou účinností. (Shamji et al., 2017)

IgE-BF vyjadřuje míru, do jaké může určitá řada faktorů zabránit vazbě sIgE na příslušný alergen. Tento biomarker není pro klinické využití příliš vhodný, protože je jeho dostupnost omezená. Test IgE-FAB, jež se provádí pomocí průtokové cytometrie, měří vazbu komplexů alergen-IgE na B lymfocyty. Některé studie ukázaly, že by vyšetření IgE-FAB mohlo v budoucnu fungovat jako možná náhrada klinických hodnocení. Ve studiích SAIT se také objevují další in vitro testy, jako je test aktivace bazofilů, stanovení cytokinů nebo vyšetření buněčných markerů. (Shamji et al., 2017)

Klinické studie SAIT dále využívají ve svých výzkumech in vivo biomarkery, zejména provokační testy. Přestože jsou kožní prick testy v rámci diagnostiky součástí každodenní praxe, nefungují jako nástroj pro monitorování účinků SAIT. Na druhou stranu EMA doporučuje provokační testy používat jako primární koncové body v těch studiích, které se zaměřují na průkaz koncepce a stanovení dávky SAIT. (Shamji et al., 2017)

## 7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 7.1 Charakteristika sledovaného souboru

Jedná se o randomizovaný soubor 32 polinotiků s dominující vazbou na pyl travin, s projevy sezónní alergické rinokonjunktivitidy, z toho 18 pacientů s projevy bronchiálního astmatu charakteru lehkého intermitentního až lehkého perzistujícího. U části nemocných byl přítomen atopický ekzém ve stabilizovaném stavu. Diagnóza byla potvrzena anamnézou, klinickým obrazem, prick testy a vyšetřením specifického IgE. Tito pacienti nebyli dosud léčeni SAIT a neměli žádné kontraindikace pro SAIT. Podmínkou vstupu do studie byla anamnéza perzistující alergické rinokonjunktivitidy s dominující vazbou na pyl trav po dobu nejméně dvou let. Tíže alergické rinokonjunktivitidy byla dle klinických příznaků v korelujícím pylovém období středně těžká až těžká. Průměrný věk pacientů v souboru byl 36 let při vstupu do studie (věkové rozmezí 20 až 61), z toho 17 mužů a 15 žen.

Farmakoterapie pacientů z hlediska nosních a očních příznaků byla standardně prováděna dle doporučení Evropské akademie pro alergologii a klinickou imunologii a WHO (World Health Organization) (pokyny ARIA – alergická rýma a její dopad na astma, doi: 10.1016/j.jaci.2017.03.050), léčba alergického eozinofilního astmatu byla stupňovitá dle obecně platného doporučení GINA (Global Initiative for Asthma).

Účast pacienta ve studii byla dobrovolná. Podmínkou vstupu do studie bylo informování pacienta o charakteru studie s podepsáním „Informovaného souhlasu pacienta“. Osobní data pacientů jsou uchována s plnou důvěrností, v souladu se současnými zákony ČR.

Soubor tvoří 2 skupiny polinotiků:

a) soubor pacientů léčených SLIT:

19 pacientů (10 mužů, 9 žen, průměrný věk 34 let)

b) kontrolní soubor pacientů léčených symptomatickou léčbou:

13 pacientů (7 mužů, 6 žen, průměrný věk 39 let)

## **7.2 Oralair – informace, schéma užívání**

Sublingvální tablety léku Oralair 100 IR & 300 IR obsahují směs standardizovaných alergenových extraktů z 5 druhů pylů trav: srha laločnatá, tomka vonná, jíllek vytrvalý, lipnice luční a bojínek luční. Přípravek Oralair je určen k léčbě alergické rýmy (se zánětem spojivek či bez něj) způsobené pyly trav. Lék je možné podávat dospělým, dospívajícím a dětem starším 5 let, jež mají klinické symptomy alergie a je u nich potvrzena senzibilizace na pyly trav pozitivním kožním testem a/nebo pozitivním titrem specifických IgE. Léčbu může předepisovat lékař, který je odpovídajícím způsobem proškolen a má praxi s léčbou alergických onemocnění. (příbalová informace přípravku Oralair)

Terapie se zahajuje 4 měsíce před započítáním pylového období travin a pokračuje do konce sezóny. Úvodní fáze léčby (první měsíc) začíná třídním vzestupným dávkováním: 1. den se užívá jedna tableta 100 IR (index reaktivity), 2. den dvě tablety 100 IR a 3. až 30. den jedna tableta 300 IR. Následující měsíc se pokračuje léčbou udržovací, kde pacient užívá jednu tabletu 300 IR denně až do konce pylového období. (příbalová informace přípravku Oralair)

## **7.3 Metodika**

### **7.3.1 Odběry a zpracování vzorků**

Odběry vzorků probíhaly v předem naplánovaných termínech v letech 2013 až 2015. První odběr byl získán těsně před zahájením léčby. V každém naplánovaném termínu měření byla sledovaným pacientům venepunkcí odebrána krev do zkumavky se separačním gelem. Odebraný vzorek krve se vždy nechal při pokojové teplotě 30 minut srážet. V laboratoři se zkumavka se vzorkem krve zcentrifugovala (15 minut při 1000 x g) a ze séra byl vytvořen alikvot. Ten byl následně zamražen a do zpracování udržován při teplotě - 20 °C. V podobě alikvotů byly skladovány všechny odebrané vzorky. Před stanovením specifických IgG protilátek bylo nutné vzorky vždy rozmrazit a nechat vytemperovat na pokojovou teplotu.



### **7.3.2 Vizuální analogová škála (VAS)**

Pro hodnocení alergických symptomů před a během SLIT byl použit jednoduchý ukazatel, kterým je vizuální analogová škála. Pomocí VAS může pacient posoudit kontrolu nad alergickým onemocněním a celkově jeho průběh. Použitý model VAS spočíval v tom, že pacient měl za úkol obodovat úroveň svých příznaků pomocí 100mm vertikální stupnice, na které 0 bodů odpovídá žádným příznakům a 100 bodů nejvyšší úrovni příznaků. Toto hodnocení bylo prováděno v letech 2012 až 2015 vždy jednou ročně, a to přibližně uprostřed pylové sezóny.

### **7.3.3 Stanovení specifických IgG4 proti pylovým alergenům**

#### ***7.3.3.1 Princip stanovení***

Specifické IgG4 protilátky proti pylovým alergenům byly stanoveny ELISA metodou. V jamkách mikrotitrační destičky byly navázány specifické alergeny bojínku (G6) nebo směs jarních pylů trav (GX1). Do jamek byly přidány naředěné vzorky sér pacientů, kalibrační standardy a kontrolní vzorky. Pokud byly přítomné specifické protilátky, navázaly se během inkubace na alergeny. Následně byly jamky promyty a tím odstraněny nenavázané složky sér. Do jamek byl poté přidán roztok zvířecí protilátky namířené proti lidskému IgG4 značené enzymem, křenovou peroxidázou (konjugát). Konjugát se navázal na IgG4 pacienta. Po inkubaci a promytí bylo množství specifických IgG4 protilátek kvantifikováno pomocí substrátu, který byl přidán do jamek. Ten byl peroxidázou přeměněn na barevnou formu, kterou bylo možné fotometricky změřit. Intenzita zbarvení v jamkách je úměrná koncentraci specifických IgG4 protilátek ve vzorku.

#### ***7.3.3.2 Vybavení a materiál***

##### **Biologický materiál:**

Test se provádí v séru získaném centrifugací sražené plné krve pacienta.

### **Přístroje a diagnostika:**

Automatické pipety na objemy 1-5  $\mu\text{L}$ , 5-50  $\mu\text{L}$ , 50-200  $\mu\text{L}$ ; termostat na 37 °C; centrifuga; fotometr na mikrotitrační destičky (ELISA reader) a Multiskan RC (Thermo Scientific); promývačka na mikrotitrační destičky MW-12A (Mindray); jamky mikrotitrační destičky s navázaným specifickým alergenem (Antigen-coated-strips G6, GX1, Dr.FOOKE Laboratorien GmbH, Německo); souprava na stanovení specifických IgG4 protilátek (Specific IgG4 – ELISA, Dr.FOOKE Laboratorien GmbH, Německo); souprava obsahující kalibrační standardy a kontroly (Reference kit Specific IgG4, Dr.FOOKE Laboratorien GmbH, Německo)

### **7.3.3.3 Postup stanovení**

1. Připravíme a překontrolujeme vzorky sér pacientů a kontrol
2. Připravíme si soupravu na stanovení specifických IgG4 protilátek, soupravu na kalibraci a stripy s jamkami potaženými alergeny
3. Rozmyšlíme rozložení kalibračních standardů, kontrol a vzorků na ELISA (mikrotitrační destičce)
4. Vzorky pacientů předem naředíme diluentem ze soupravy Specific IgG4-ELISA 100x
5. Napipetujeme ředěné vzorky, kalibrátory a kontroly do destičky po 100  $\mu\text{L}$  na jamku
6. Inkubujeme 1 hodinu při 37 °C
7. Promyjeme destičku na promývačce minimálně 3x
8. Do všech jamek napipetujeme roztok konjugátu po 100  $\mu\text{L}$  na jamku
9. Inkubujeme znovu 1 hodinu při 37 °C
10. Opakujeme promytí destičky minimálně 3x promývacím pufrem
11. Přidáme do všech jamek 100  $\mu\text{L}$  roztoku substrátu a inkubujeme cca 10 minut v temnu

12. Po vybarvení jamek zastavíme enzymovou reakci přidáním 50  $\mu\text{L}$  zastavovacího roztoku (0,5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
13. Destičku změříme na fotometru (ELISA readeru) při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 620 nm
14. Naměřené absorbance vyhodnotíme pomocí software Genesis, který sestaví z absorbancí kalibračních standardů kalibrační křivku, stanoví její matematickou podobu a pomocí naměřených absorbancí jednotlivých vzorků vypočítá koncentrace specifických IgG4 protilátek
15. Do výsledných koncentrací započítáme ředící faktor vzorků (100)

Měřením získáme koncentrace specifických IgG4 protilátek proti alergenu bojínku (G6) a proti směsi jarních pylů trav (GX1) v arbitrárních jednotkách U/mL. Alergen bojínek byl vyčleněn jako samostatný alergen oproti směsi GX1 z toho důvodu, že je považován za hlavní alergen této směsi.

### **7.3.4 Stanovení specifických IgG1, IgG2 a IgG3 proti pylovým alergenům**

#### **7.3.4.1 Princip stanovení**

Specifické IgG1, IgG2 a IgG3 protilátky proti pylovým alergenům byly stanoveny ELISA metodou. Každá podtřída protilátek proti pylovým alergenům byla vyšetřována v oddělené ELISA destičce. Jamky v destičkách byly potaženy specifickými alergeny bojínku (G6) nebo směsí alergenů jarních trav (GX1). Do jamek byly přidány naředěné vzorky sér pacientů. Pokud byly přítomné specifické protilátky, navázaly se během inkubace na alergeny. Následně byly jamky promyty a tím odstraněny nenavázané složky sér. Do jamek byly poté přidány roztoky konjugátů zvířecích protilátek proti jednotlivým podtřídám lidského IgG (IgG1, IgG2 a IgG3 značených enzymem), do každé ze tří destiček odpovídající konjugát. Po inkubaci a promytí všech tří destiček byl do všech jamek přidán substrát a po objevení zbarvení byly reakce ve všech třech destičkách zastaveny roztokem kyseliny. Intenzita zbarvení v jamkách je úměrná koncentraci specifických IgG1, IgG2 a IgG3 protilátek ve vzorku.

### **7.3.4.2 Vybavení a materiál**

#### **Biologický materiál:**

Test se provádí v séru získaném centrifugací sražené plné krve pacienta.

#### **Přístroje a diagnostika:**

Automatické pipety na objemy 1-5  $\mu\text{L}$ , 5-50  $\mu\text{L}$ , 50-200  $\mu\text{L}$ ; termostat na 37 °C; centrifuga; fotometr na mikrotitrační destičky (ELISA reader) a Multiskan RC (Thermo Scientific); promývačka na mikrotitrační destičky MW-12A (Mindray); jamky mikrotitrační destičky s navázaným specifickým alergenem (Antigen-coated-strips G6, GX1, Dr.FOOKE Laboratorien GmbH, Německo); souprava obsahující specifické konjugáty (zvířecí protilátky proti lidským podtřídám IgG značené enzymaticky) IM50 Human IgG Subclass Screening Kit (Cygnus Technologies); souprava obsahující další potřebné reagenty pro ELISA metody DuoSet™ Ancillary Reagent Kit 1 (RD Systems)

### **7.3.4.3 Postup stanovení**

1. Připravíme a překontrolujeme vzorky sér pacientů a sérum kontrolního pacienta (standard)
2. Připravíme si všechny potřebné imunoreagenty a necháme je vytemperovat na teplotu místnosti
3. Rozmyslíme rozložení vzorků na ELISA destičkách. Na každou destičku umístíme standard (vzorek vybraného kontrolního pacienta). Do 3 destiček (v každé budeme analyzovat protilátky jiné podtřídy: IgG1, IgG2 a IgG3) si připravíme stripy (jamky) potažené alergenem bojínku (G6) a do dalších tří destiček (opět pro IgG1, IgG2 a IgG3) vložíme jamky potažené směsí jarních pylů trav (GX1)
4. Vzorky pacientů předem naředíme dilučním roztokem 100x; naředíme i vzorek kontrolního pacienta, který napipetujeme na každou destičku v duplikátu (2x)
5. Napipetujeme naředěné vzorky dle zvoleného schématu po 100 $\mu\text{L}$  na jamku
6. Inkubujeme 1 hodinu při 37 °C
7. Připravíme promývací roztok

8. Naředíme konjugáty IgG1, IgG2 a IgG3 50x (např. 200 µL konjugátu na 10 mL dilučního roztoku na 1 destičku)
9. Promyjeme destičky na promývačce minimálně 3x
10. Napipetujeme konjugáty do jednotlivých destiček IgG1, IgG2 a IgG3 po 100 µL na jamku
11. Inkubujeme 1 hodinu při 37 °C
12. Připravíme substrátový roztok smísením stejných dílů roztoků A a B (1:1)
13. Opakujeme promytí destiček minimálně 3x promývacím roztokem
14. Napipetujeme substrátový roztok do všech destiček po 100 µL na jamku
15. Inkubujeme 10–15 minut v temnu, průběžně sledujeme vývoj zbarvení
16. Po vybarvení jamek zastavíme enzymovou reakci přidáním 50 µL zastavovacího roztoku (0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
17. Do 5 minut fotometricky změříme destičky při 450nm (nastavíme referenční vlnovou délku na 620nm)
18. Naměřené absorbance podělíme průměrnou hodnotou absorbance vzorku kontrolního pacienta (standardu) ze stejné destičky. Získáme indexy, které popisují hodnoty specifických protilátek IgG1, IgG2 nebo IgG3 proti alergenům bojínku (G6) a proti směsi jarních pylů trav (GX1).

### **7.3.5 Metoda statistického hodnocení**

Pro statistické hodnocení výsledků byl využit statistický software MedCalc (MedCalc Software Ltd, Belgium). Kolmogorovův-Smirnovův test normality prokázal, že se jedná o hodnoty s nenormálním rozdělením. Z tohoto důvodu byly pro další statistickou analýzu použity neparametrické testy, a to Mann-Whitneyův U test a Wilcoxonův párový test. Na základě provedení těchto testů lze určit, zda jsou mezi výsledky stanovení statisticky významné rozdíly či změny. Hladina statistické významnosti byla nastavena na hodnotu  $p \leq 0,05$ . Naměřené a vypočítané hodnoty byly zpracovány do tabulek a grafů.

## 8. VÝSLEDKY

### 8.1 Výsledky VAS

V Tabulka 3 je zaznamenáno statistické hodnocení a porovnání výsledků VAS obou souborů. U pacientů léčených Oralirem byl před začátkem terapie (v roce 2012) průměrný počet bodů  $65,9 \pm 12,5$ . Počet bodů u kontrolního souboru byl ve stejném roce v průměru nižší  $53,5 \pm 16,1$  ( $p = 0,0265$ ). V prvním roce terapie (2013) se bodový průměr u souboru s Oralirem snížil na  $33,6 \pm 20,9$ . Výsledné skóre bodů bylo oproti kontrolnímu souboru významně rozdílné ( $p = 0,0009$ ), jelikož u kontrolního souboru zůstal počet bodů stále vysoký –  $52,5 \pm 15,3$ . V roce 2014 byl u pacientů léčených Oralirem zaznamenán pokles bodů na  $26,7 \pm 20,2$ , proto se statistická významnost ještě zvýšila ( $p = 0,0006$ ). Největší zjištěný rozdíl výsledků obou souborů byl v roce 2015 ( $p < 0,0001$ ).

U souboru léčeného Oralirem bylo při porovnání výsledků VAS možné pozorovat, že před zahájením terapie (2012) bylo průměrné bodové skóre vždy vyšší než kterýkoliv následující rok. Léčení pacienti zaznamenávali své symptomy významně stále nižším počtem bodů do roku 2014. Mezi roky 2014 a 2015 nebyl v získaných výsledcích nalezen signifikantní rozdíl. Výsledky stanovení jsou shrnuty v Tabulka 3 a Graf 1.

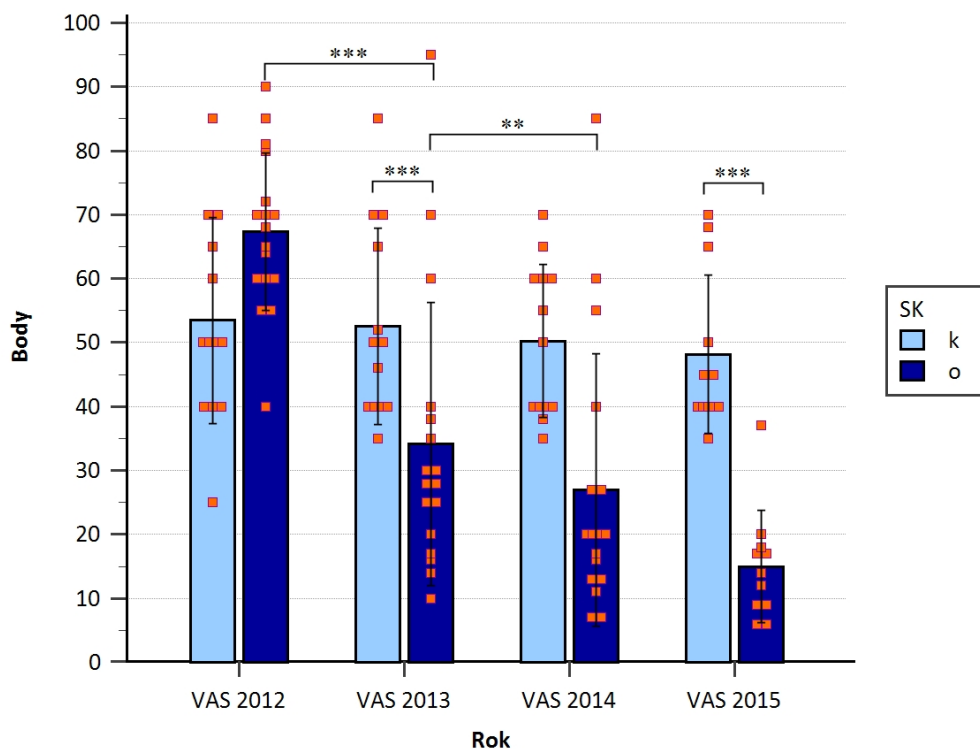
**Tabulka 3 Výsledky VAS za jednotlivé roky u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání**

Odběr	Oralair			KS			Statistická významnost (Oralair vs KS)
	n	Průměr $\pm$ SD počtu bodů	Medián	n	Průměr $\pm$ SD počtu bodů	Medián	
2012	19	$65,9 \pm 12,5$	65,0	13	$53,5 \pm 16,1$	50,0	0,0265
2013	19	$33,6 \pm 20,9$	28,0	13	$52,5 \pm 15,3$	50,0	0,0009
2014	19	$26,7 \pm 20,2$	20,0	13	$50,2 \pm 12,0$	50,0	0,0006
2015	12	$14,5 \pm 8,5$	13,0	12	$48,2 \pm 12,4$	42,5	<0,0001

Zdroj: vlastní

**KS** – kontrolní soubor, **n** – počet analyzovaných hodnot, **SD** – směrodatná odchylka

**Graf 1 Porovnání výsledků VAS u pacientů léčených Oralaiem a u kontrolního souboru**



Zdroj: vlastní

\*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , SK – skupina, k – kontrolní soubor, o – soubor s Oralaiem

## 8.2 Výsledky stanovení sIgG4

### 8.2.1 Výsledky stanovení sIgG4 proti směsi pylů trav (GX1)

Ze souboru léčeného Oralaiem museli být pro účely statistického a grafického hodnocení výsledků sIgG4 GX1 vyloučeni 2 pacienti, protože jejich hodnoty byly příliš odlehlé.

Na začátku byla u léčeného souboru průměrná koncentrace sIgG4 protilátek proti směsi pylů trav  $84,69 \pm 89,09$  U/mL. Již po prvním měsíci terapie (03/2013) stoupla koncentrace na  $166,69 \pm 185,46$  U/mL ( $p = 0,0203$ ). Největší nárůst, oproti koncentraci na začátku terapie, byl zaznamenán v 5. měsíci roku 2013 –  $594,93 \pm 954,50$  U/mL ( $p = 0,0003$ ). V průběhu dalšího sledování byl odhalen pokles průměrné koncentrace sIgG4 GX1 a jako statisticky významný se ukázal být rozdíl

mezi koncentracemi v odběrech 10/2013 a 02/2014 ( $p=0,0107$ ). Výsledky po 1. roce terapie (02/2014) naznačují, že u průměru sIgG4 GX1 protilátek došlo oproti jejich počáteční hodnotě k signifikantnímu zvýšení ( $p=0,0023$ ). V odběru 02/2015 se protilátková odpověď ještě zvýšila ( $p=0,0098$ ). Tyto výsledky ukazuje Tabulka 4 a Graf 2.

**Tabulka 4 Koncentrace sIgG4 GX1 v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání**

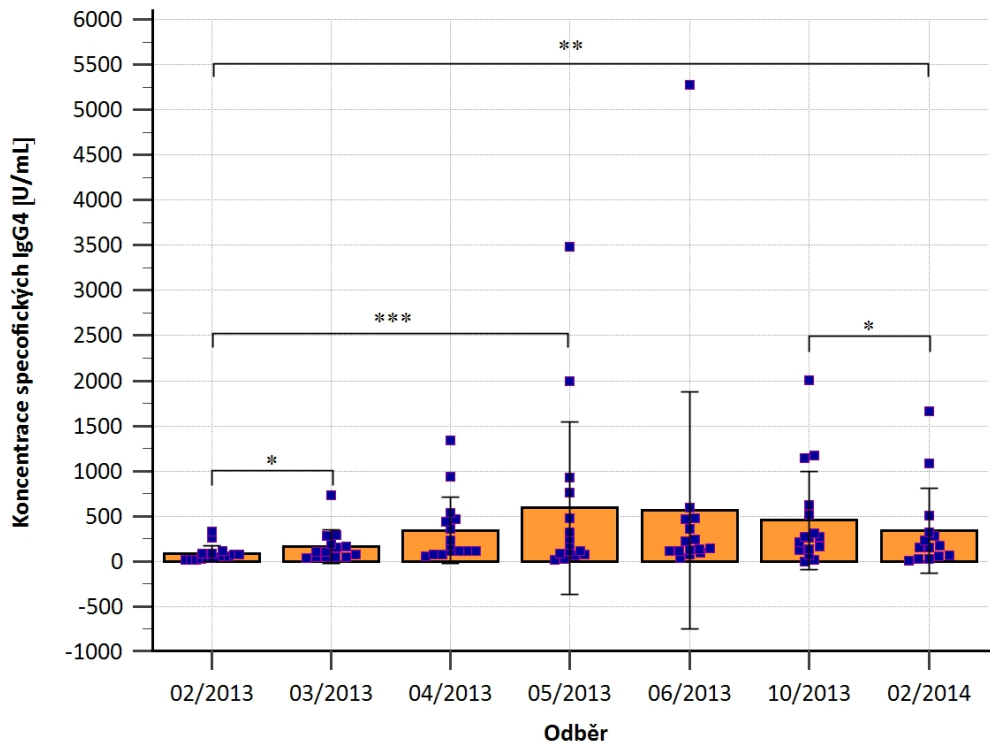
Odběr	Oralair			KS			Statistická významnost (Oralair vs KS)
	n	Průměr $\pm$ SD koncentrac e [U/mL]	Medián	n	Průměr $\pm$ SD koncentrac e [U/mL]	Medián	
02/2013	16	84,69 $\pm$ 89,09	55,65	13	116,94 $\pm$ 96,95	88,30	0,3983
03/2013	14	166,69 $\pm$ 185,46	106,50	—	—	—	—
04/2013	15	343,75 $\pm$ 366,02	172,40	—	—	—	—
05/2013	15	594,93 $\pm$ 954,50	186,60	—	—	—	—
06/2013	15	566,64 $\pm$ 1313,14	142,20	13	111,93 $\pm$ 119,09	63,20	0,0112
10/2013	16	456,87 $\pm$ 544,99	268,65	13	144,59 $\pm$ 295,42	20,60	0,0087
02/2014	14	339,03 $\pm$ 471,41	166,80	12	137,95 $\pm$ 233,49	34,20	0,0945
02/2015	11	375,49 $\pm$ 501,38	239,900	6	36,67 $\pm$ 34,02	28,20	0,0273

Zdroj: vlastní

**KS** – kontrolní soubor, **n** – počet analyzovaných hodnot, **SD** – směrodatná odchylka



**Graf 2 Dynamika sIgG4 GX1 u pacientů léčených Oralirem během 1. roku sledování – průměr ±SD**

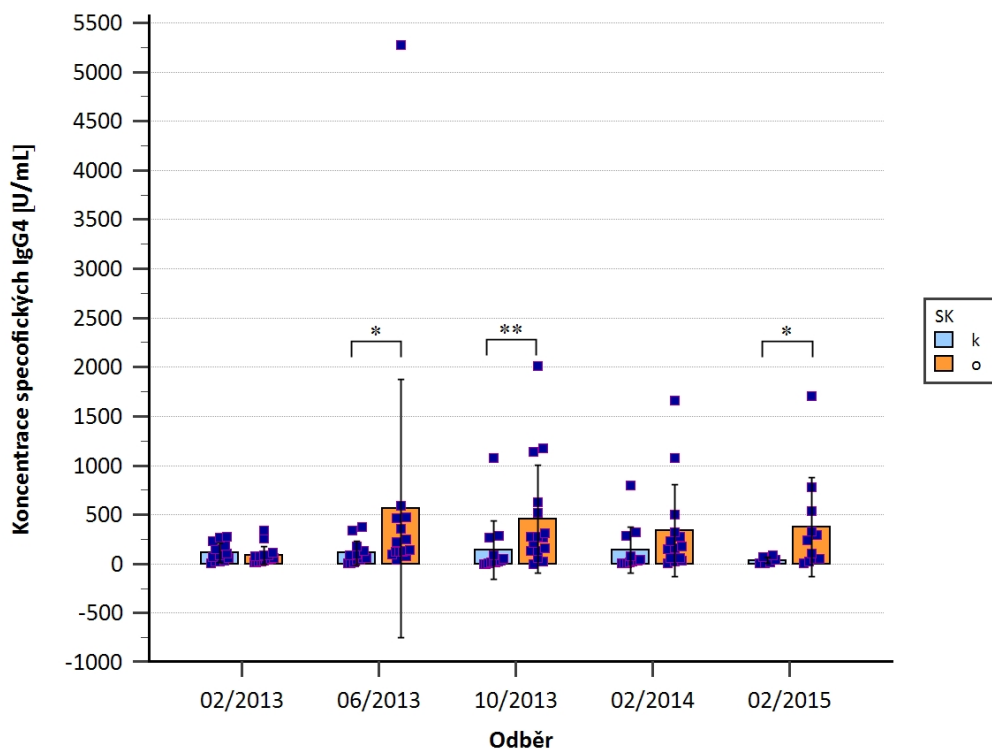


Zdroj: vlastní

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$

V některých odběrech byly získány výsledky koncentrací sIgG4 GX1 i u kontrolního souboru pacientů. Na začátku terapie se průměrné koncentrace obou souborů významně nelišily. Signifikantní rozdíl bylo možné pozorovat v odběru 06/2013 ( $p = 0,0112$ ). Statisticky významně odlišné se ukázaly být i výsledky získané v odběrech 10/2013 ( $p = 0,0087$ ) a 02/2015 ( $p = 0,0273$ ), jež je možné pozorovat v Tabulka 4 a Graf 3.

**Graf 3** Koncentrace sIgG4 GX1 u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru ve vybraných odběrech – průměr ±SD



Zdroj: vlastní

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , SK – skupina, k – kontrolní soubor, o – soubor s Oralirem

### 8.2.2 Výsledky stanovení sIgG4 proti bojínku (G6)

Ze souboru léčeného Oralirem musel být pro účely statistického a grafického hodnocení výsledků sIgG4 G6 vyloučen 1 pacient, protože naměřené hodnoty byly příliš odlehlé.

U pacientů s Oralirem byla koncentrace sIgG4 protilátek proti bojínku nazačátku léčby  $87,76 \pm 99,09$  U/mL. První měsíc terapie koncentrace významně vzrostla na  $220,694 \pm 303,502$  U/mL ( $p = 0,0052$ ). V dalších měsících roku 2013 bylo možné pozorovat stoupající trend průměrné koncentrace sIgG4 G6. Nejvyšší protilátková odpověď byla v průměru  $555,83 \pm 696,42$  U/mL naměřena v odběru 10/2013, což se ukázalo být statisticky významné oproti koncentraci protilátek na začátku terapie ( $p = 0,0001$ ). Mezi odběry 10/2013 a 02/2014 byl podobně jako u sIgG4 GX1 zaznamenán významný pokles koncentrace protilátek ( $p = 0,0003$ ). I přesto ale výsledky

ukázaly, že po 1. roce od začátku terapie došlo k nárůstu průměrné koncentrace sIgG4 G6 ( $p=0,0004$ ). V následujícím roce (odběr 02/2015) byla koncentrace nadále zvýšená ( $p=0,0137$ ). Tyto výsledky zobrazuje Tabulka 5 a Graf 4.

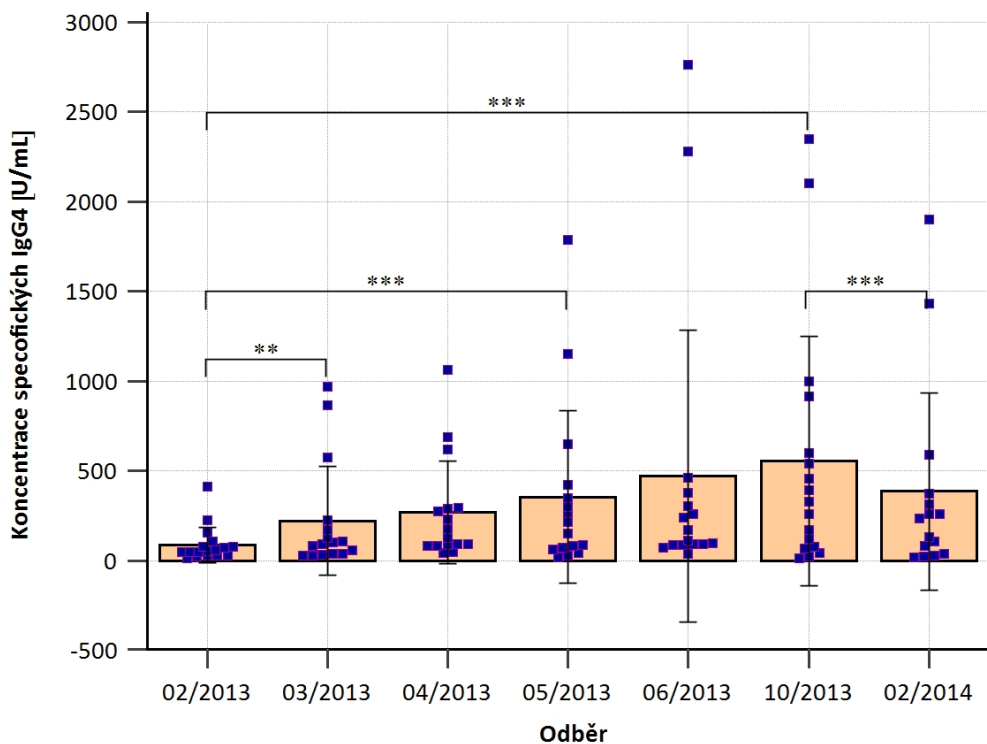
**Tabulka 5 Koncentrace sIgG4 G6 v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání**

Odběr	Oralair			KS			Statistická významnost (Oralair vs KS)
	n	Průměr $\pm$ SD koncentrace [U/mL]	Medián	n	Průměr $\pm$ SD koncentrace [U/mL]	Medián	
02/2013	17	87,76 $\pm$ 99,09	50,60	13	84,31 $\pm$ 78,21	54,70	1,0000
03/2013	16	220,69 $\pm$ 303,50	96,70	—	—	—	—
04/2013	16	267,81 $\pm$ 286,13	151,00	—	—	—	—
05/2013	16	354,98 $\pm$ 482,26	183,60	—	—	—	—
06/2013	16	470,38 $\pm$ 815,08	141,65	13	92,84 $\pm$ 77,91	65,60	0,0076
10/2013	17	555,83 $\pm$ 696,42	329,30	13	117,89 $\pm$ 217,97	19,90	0,0039
02/2014	15	384,88 $\pm$ 550,66	232,10	12	97,62 $\pm$ 148,63	22,85	0,0191
02/2015	11	339,56 $\pm$ 520,85	202,90	6	40,72 $\pm$ 25,71	40,25	0,0616

Zdroj: vlastní

**KS** – kontrolní soubor, **n** – počet analyzovaných hodnot, **SD** – směrodatná odchylka

**Graf 4 Dynamika sIgG4 G6 u pacientů léčených Oralirem během 1. roku sledování – průměr ±SD**

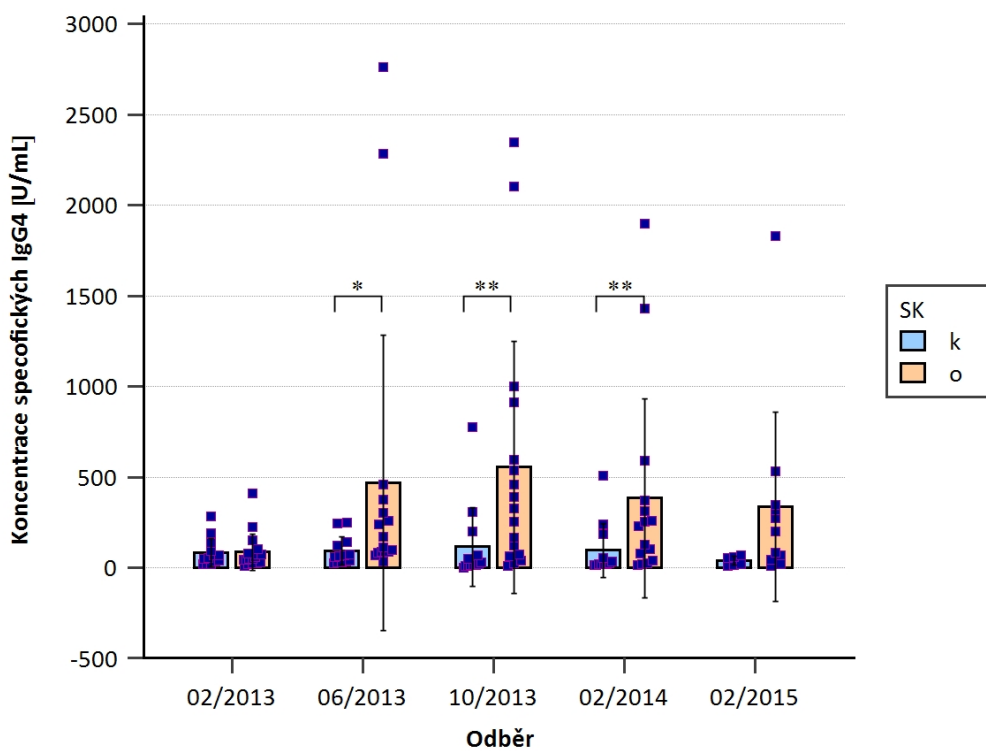


Zdroj: vlastní

\*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$

Při vzájemném porovnání výsledků obou souborů bylo možné pozorovat, že na začátku se hodnoty naměřených koncentrací v průměru téměř nelišily. Odběry v průběhu 1. roku terapie odhalily statisticky významně odlišné výsledky mezi sledovanými soubory. Největší rozdíl bylo možné pozorovat v 10. měsíci roku 2013 ( $p = 0,0039$ ), kde byly koncentrace sIgG4 G6 u kontrolního souboru průměrně stále nízké –  $117,89 \pm 217,97$  U/mL, kdežto u pacientů léčených Oralirem dosahovaly v průměru nejvyšších naměřených hodnot (viz Tabulka 5 a Graf 5).

**Graf 5 Koncentrace sIgG4 G6 u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru ve vybraných odběrech – průměr ±SD**



Zdroj: vlastní

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , SK – skupina, k – kontrolní soubor, o – soubor s Oralirem

## 8.3 Výsledky stanovení sIgG1

### 8.3.1 Výsledky stanovení sIgG1 proti směsi pylů trav (GX1)

U souboru s Oralirem bylo možné v průběhu terapie pozorovat jisté změny hladiny sIgG1 protilátek proti směsi pylů trav. Výsledné hladiny protilátek byly vyjádřené pomocí indexů. Na začátku léčby byla zjištěna průměrná hladina  $0,928 \pm 0,664$ , která se po prvním měsíci zvýšila na  $1,052 \pm 0,619$  ( $p=0,0500$ ). V následujícím odběru (06/2013) se průměr naměřených sIgG1 GX1  $1,407 \pm 0,807$  ukázal být statisticky významně vyšší než hladina na začátku terapie. Po prvním roce (odběr 02/2014) výsledky hladin dosahovaly v průměru hodnoty  $1,187 \pm 0,729$ . Zjištěný nárůst však nebyl oproti počáteční hodnotě statisticky významný. Signifikantní rozdíly hladin sIgG1 GX1 nebyly pozorovány ani při vzájemném porovnání výsledků obou souborů. Tyto výsledky je možné pozorovat v Tabulka 6 a Graf 6.

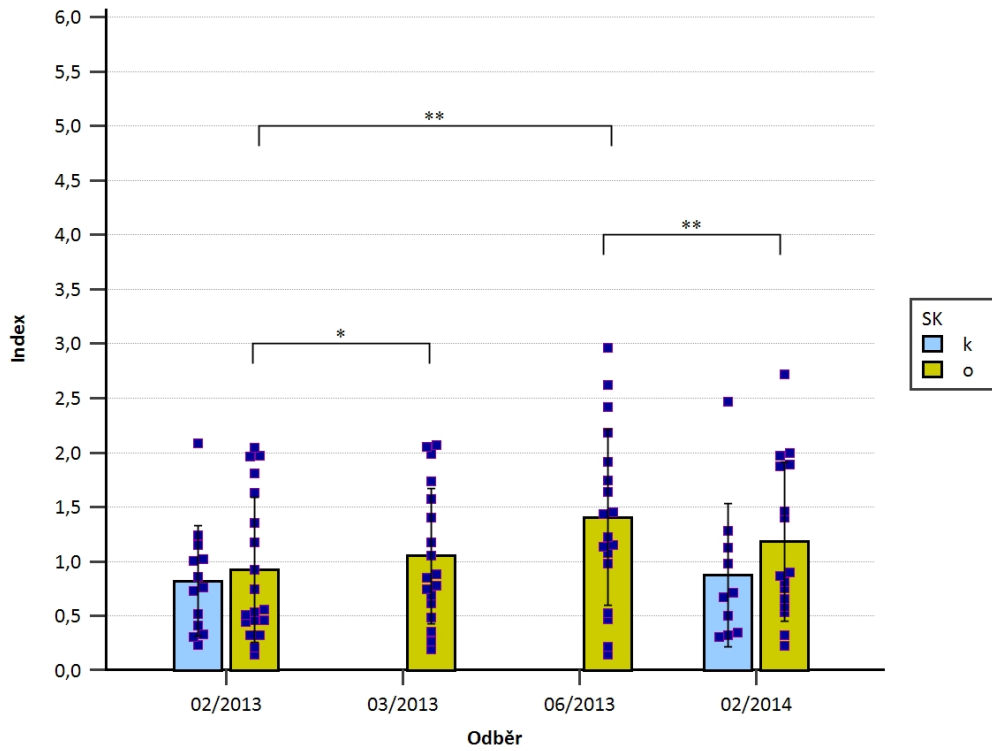
**Tabulka 6 Hladiny sIgG1 GX1 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání**

Odběr	Oralair			KS			Statistická významnost (Oralair vs KS)
	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	
02/2013	19	0,928 $\pm$ 0,664	0,558	13	0,822 $\pm$ 0,506	0,763	0,9097
03/2013	18	1,052 $\pm$ 0,619	0,868	—	—	—	—
06/2013	18	1,407 $\pm$ 0,807	1,334	—	—	—	—
02/2014	16	1,187 $\pm$ 0,729	0,887	10	0,874 $\pm$ 0,658	0,691	0,2857

Zdroj: vlastní

KS – kontrolní soubor, n – počet analyzovaných hodnot, SD – směrodatná odchylka

**Graf 6 Hladiny sIgG1 GX1 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr ±SD**



Zdroj: vlastní

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , SK – skupina, k – kontrolní soubor, o – soubor s Oralirem

### 8.3.2 Výsledky stanovení sIgG1 proti bojínku (G6)

Výsledné hladiny sIgG1 proti bojínku vyjádřené pomocí indexů ukázaly, že v průběhu terapie docházelo u pacientů s Oralirem ke statisticky významným změnám v protilátkové odpovědi. Nárůst průměrné hladiny sIgG1 G6 byl možný pozorovat např. mezi odběrem na začátku terapie a odběrem v 6. měsíci roku 2013 ( $p=0,0028$ ). Zároveň v tomto měsíci byla protilátková odpověď ze všech odběrů v průměru nejvyšší –  $1,952 \pm 1,237$ . I přestože byla průměrná hladina sIgG1 G6 po 1.roce terapie (odběr 02/2014) vyšší než na jejím začátku, nebyla nalezena mezi výsledky statistická významnost. Výsledky stanovení jsou vyobrazeny v Tabulka 7 a Graf 7.

Při vzájemném porovnání výsledků obou souborů byla nalezena významná odlišnost protilátkové odpovědi pouze v odběru 06/2013 ( $p=0,0449$ ) (viz Tabulka 7 a Graf 7).

**Tabulka 7 Hladiny sIgG1 G6 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání**

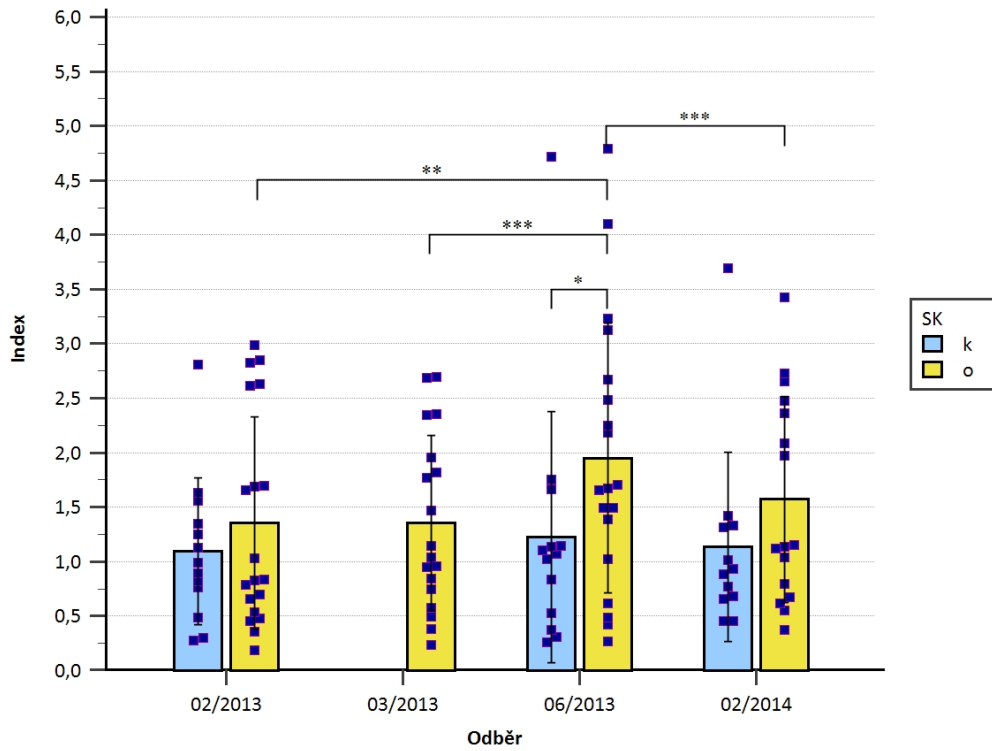
Odběr	Oralair			KS			Statistická významnost (Oralair vs KS)
	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	
02/2013	19	1,358 $\pm$ 0,975	0,834	13	1,097 $\pm$ 0,674	0,993	0,6773
03/2013	18	1,359 $\pm$ 0,803	1,091	—	—	—	—
06/2013	19	1,952 $\pm$ 1,237	1,672	13	1,224 $\pm$ 1,153	1,069	0,0449
02/2014	16	1,573 $\pm$ 0,947	1,144	12	1,134 $\pm$ 0,869	0,911	0,2601

Zdroj: vlastní

*KS* – kontrolní soubor, *n* – počet analyzovaných hodnot, *SD* – směrodatná odchylka



**Graf 7 Hladiny sIgG1 G6 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr ±SD**



Zdroj: vlastní

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , SK – skupina, k – kontrolní soubor, o – soubor s Oralirem

## 8.4 Výsledky stanovení sIgG2

### 8.4.1 Výsledky stanovení sIgG2 proti směsi pylů trav (GX1)

Výsledky stanovení sIgG2 proti směsi pylů trav u souboru s Oralirem naznačují, že v průběhu léčby docházelo průměrně k mírným změnám protilátkové odpovědi. Na začátku terapie byla hladina sIgG2 GX1  $1,052 \pm 1,138$  (vyjádřeno jako index). Statisticky významný rozdíl průměrné hladiny protilátek byl zjištěn pouze mezi odběry z 3. a 6. měsíce roku 2013 ( $p = 0,0311$ ). Po prvním roce terapie (odběr 02/2014) dosahovala hladina v průměru hodnoty  $1,172 \pm 1,151$ , avšak podobně jako u výsledků stanovení sIgG1 GX1 nebylo zjištěno, že by zvýšená protilátková odpověď byla oproti té počáteční statisticky významná.

Mezi odběry, ve kterých byly naměřeny sIgG2 GX1 i pro kontrolní soubor, bylo při srovnání výsledků obou souborů možné pozorovat významné odlišnosti hladiny protilátek už na začátku sledování ( $p = 0,0133$ ) a poté v menší míře i v odběru 02/2014 ( $p = 0,0408$ ).

Přehled výsledků obou souborů je možné pozorovat v Tabulka 8 a v Graf 8.

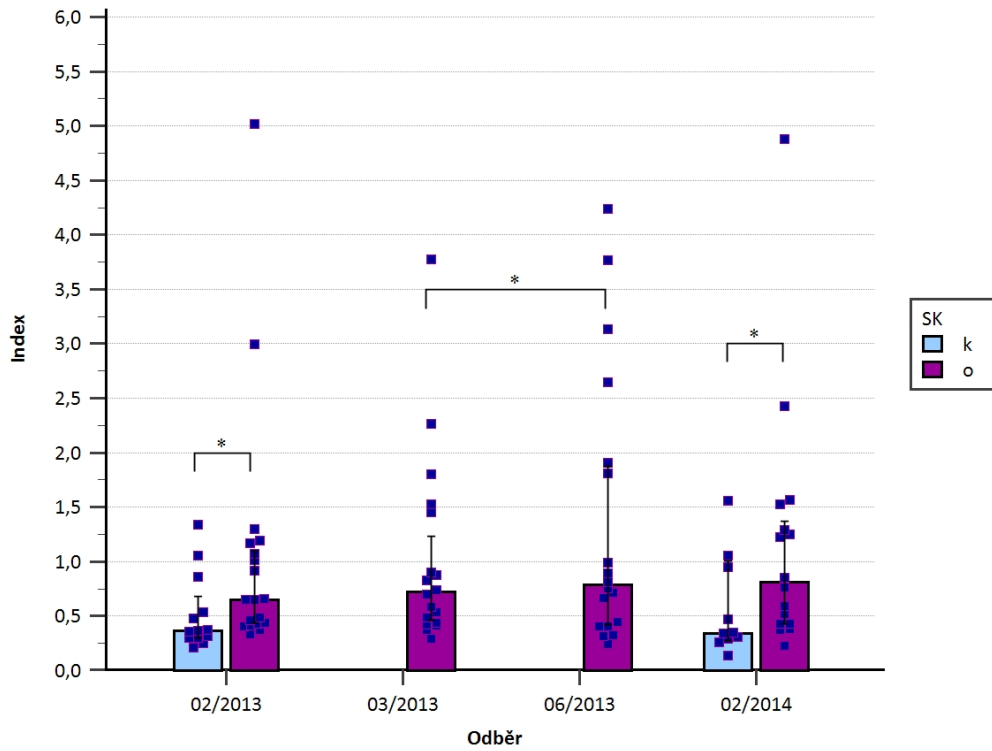
**Tabulka 8 Hladiny sIgG2 GX1 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání**

Odběr	Oralair			KS			Statistická významnost (Oralair vs KS)
	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	
02/2013	19	1,052 $\pm$ 1,138	0,648	13	0,519 $\pm$ 0,346	0,362	0,0133
03/2013	18	1,023 $\pm$ 0,880	0,720	—	—	—	—
06/2013	18	1,360 $\pm$ 1,269	0,785	—	—	—	—
02/2014	16	1,172 $\pm$ 1,151	0,808	10	0,572 $\pm$ 0,460	0,342	0,0408

Zdroj: vlastní

KS – kontrolní soubor, n – počet analyzovaných hodnot, SD – směrodatná odchylka

**Graf 8 Hladiny sIgG2 GX1 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr ±SD**



Zdroj: vlastní

\* –  $p < 0,05$ , SK – skupina, k – kontrolní soubor, o – soubor s Oralirem

## 8.4.2 Výsledky stanovení sIgG2 proti bojínku (G6)

Výsledky stanovení sIgG2 proti bojínku u pacientů léčených Oralirem přinesly podobné informace o vývoji protilátkové odpovědi, jako při stanovení sIgG2 proti směsi pylů trav. I zde byla nalezena statisticky významná změna pouze mezi odběry 03/2013 a 06/2013 ( $p = 0,0342$ ). Hladiny sIgG2 G6 vyjádřené pomocí indexů byly na začátku terapie v průměru nižší –  $1,442 \pm 1,606$ , než hladiny naměřené po 1. roce (02/2014) od začátku sledování –  $1,567 \pm 1,655$ . Tento zjištěný nárůst však nebyl statisticky významný.

Při porovnání výsledků protilátkové odpovědi obou souborů, byl nalezen významný rozdíl pouze v odběru z 6. měsíce roku 2013 (0,0077). V tomto odběru byla průměrná hladina sIgG2 G6 ze všech odběrů u souboru s Oralirem nejvyšší –  $1,782 \pm 1,729$  a naopak u kontrolního souboru nejnižší –  $0,613 \pm 0,476$ .

Výsledky obou souborů jsou zaznamenány v Tabulka 9 a Graf 9.

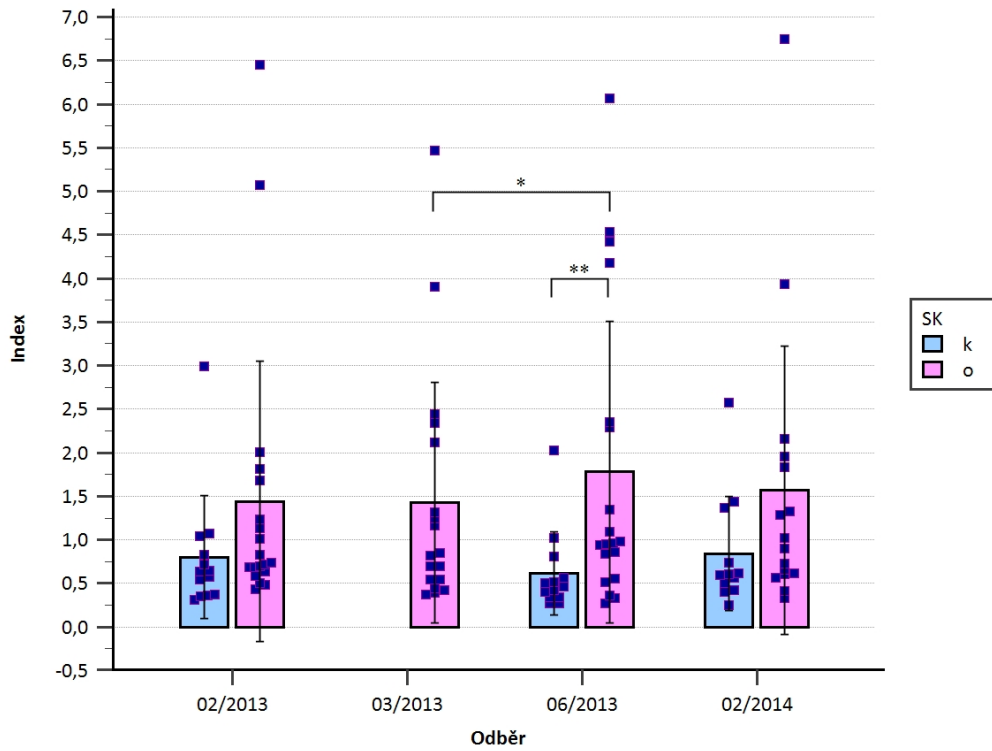
**Tabulka 9 Hladiny sIgG2 G6 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání**

Odběr	Oralair			KS			Statistická významnost (Oralair vs KS)
	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	
02/2013	19	1,442 $\pm$ 1,606	0,742	13	0,803 $\pm$ 0,703	0,633	0,0594
03/2013	18	1,431 $\pm$ 1,380	0,832	—	—	—	—
06/2013	19	1,782 $\pm$ 1,729	0,961	13	0,613 $\pm$ 0,476	0,461	0,0077
02/2014	16	1,567 $\pm$ 1,655	0,961	12	0,842 $\pm$ 0,656	0,603	0,1144

Zdroj: vlastní

**KS** – kontrolní soubor, **n** – počet analyzovaných hodnot, **SD** – směrodatná odchylka

**Graf 9 Hladiny sIgG2 G6 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr  $\pm$ SD**



Zdroj: vlastní

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , SK – skupina, k – kontrolní soubor, o – soubor s Oralirem

## 8.5 Výsledky stanovení sIgG3

### 8.5.1 Výsledky stanovení sIgG3 proti směsi pylů trav (GX1)

Výsledky stanovení sumarizované v Tabulka 10 a Graf 10 ukazují, že se v průběhu terapie u souboru s Oralirem průměrná odpověď sIgG3 proti směsi pylů trav výrazně neměnila. Na začátku byl průměr hladin sIgG3 GX1  $1,014 \pm 0,542$  (vyjádřeno indexem) a po prvním měsíci léčby  $0,972 \pm 0,505$ . Výsledné hladiny se mezi sebou statisticky významně nelišily. Signifikantní rozdíly nebyly nalezeny ani mezi výsledky ostatních odběrů.

Porovnáním výsledků od léčených pacientů a kontrolního souboru bylo zjištěno, že se protilátková odpověď sIgG3 GX1 mezi oběma soubory významně nelišila. Výsledky obou souborů jsou zaznamenány v Tabulka 10 a Graf 10.

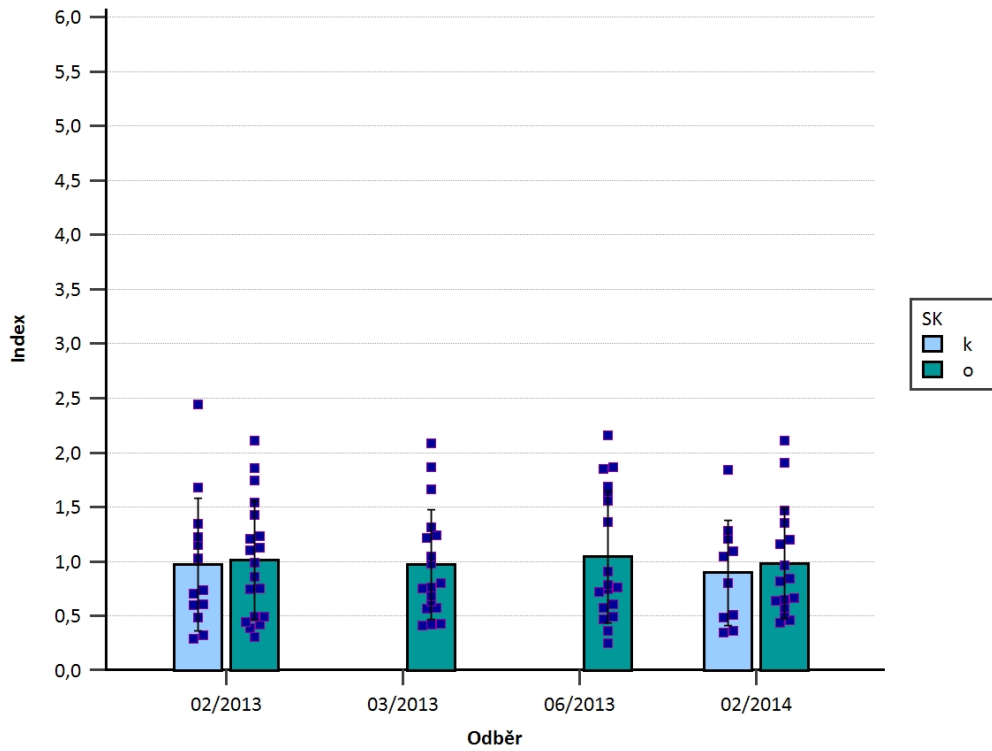
**Tabulka 10 Hladiny sIgG3 GX1 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání**

Odběr	Oralair			KS			Statistická významnost (Oralair vs KS)
	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	n	Průměr $\pm$ SD [index]	Medián	
02/2013	19	1,014 $\pm$ 0,542	0,991	13	0,973 $\pm$ 0,607	0,736	0,7053
03/2013	18	0,972 $\pm$ 0,505	0,787	—	—	—	—
06/2013	18	1,046 $\pm$ 0,604	0,777	—	—	—	—
02/2014	16	0,986 $\pm$ 0,510	0,832	10	0,899 $\pm$ 0,484	0,928	0,5865

Zdroj: vlastní

**KS** – kontrolní soubor, **n** – počet analyzovaných hodnot, **SD** – směrodatná odchylka

**Graf 10 Hladiny sIgG3 GX1 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralairem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr  $\pm$ SD**



Zdroj: vlastní

SK – skupina, k – kontrolní soubor, o – soubor s Oralairem

## 8.5.2 Výsledky stanovení sIgG3 proti bojínku (G6)

U souboru s Oralirem bylo možné v průběhu terapie pozorovat pouze mírné kolísání průměrné hladiny sIgG3 proti bojínku. Na začátku byla průměrná hladina sIgG3 G6  $0,896 \pm 0,489$  (vyjádřeno indexem). Po prvním měsíci byla naměřena hladina sIgG3 G6  $0,879 \pm 0,457$ . V následujícím odběru (06/2013) průměr hladiny dosáhl hodnoty  $0,933 \pm 0,546$ . Podobně jako u výsledků stanovení sIgG3 GX1 nebylo zjištěno, že by změny v protilátkové odpovědi byly statisticky významné.

V odběrech, kde byly získány výsledky i od pacientů z kontrolního souboru, bylo provedeno porovnání mezi soubory navzájem. Výsledky obou souborů se v jednotlivých odběrech příliš nelišily, proto ani jejich rozdíl nebyl statisticky významný.

Přehled výsledků stanovení sIgG3 G6 je možné pozorovat v Tabulka 11 a Graf 11.

**Tabulka 11 Hladiny sIgG3 G6 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání**

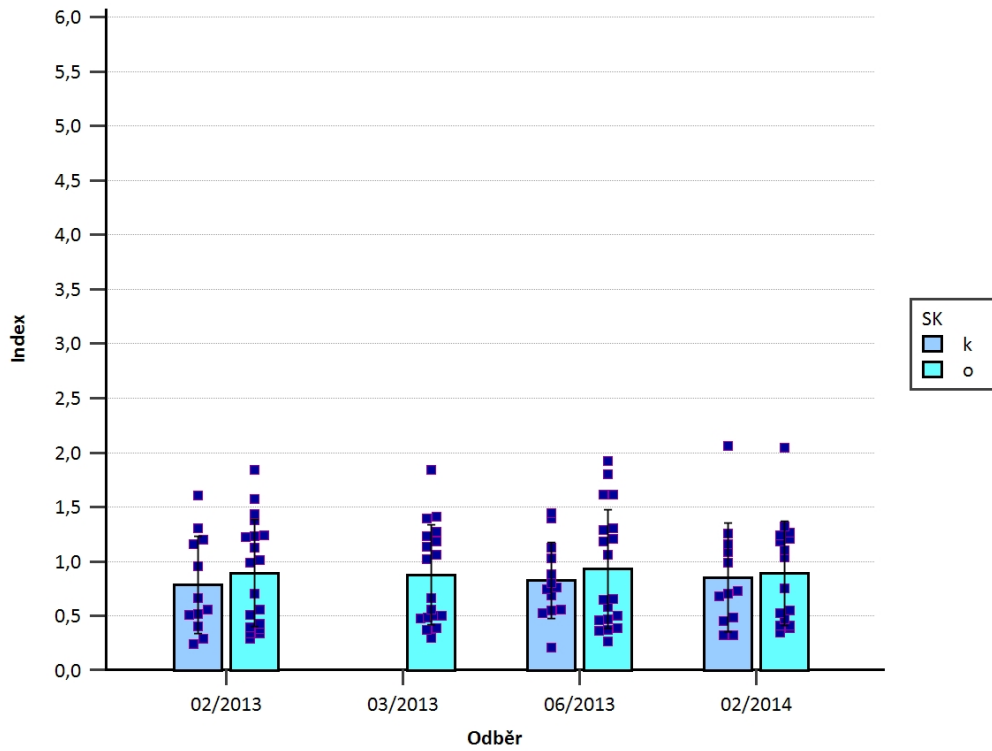
Odběr	Oralair			KS			Statistická významnost (Oralair vs KS)
	n	Průměr $\pm$ SD (index)	Medián	n	Průměr $\pm$ SD (index)	Medián	
02/2013	19	0,896 $\pm$ 0,489	0,992	12	0,928 $\pm$ 0,667	0,610	0,5894
03/2013	18	0,879 $\pm$ 0,457	0,843	—	—	—	—
06/2013	19	0,933 $\pm$ 0,546	0,659	13	0,827 $\pm$ 0,352	0,761	0,9698
02/2014	16	0,893 $\pm$ 0,480	0,900	12	0,856 $\pm$ 0,497	0,717	0,6642

Zdroj: vlastní

**KS** – kontrolní soubor, **n** – počet analyzovaných hodnot, **SD** – směrodatná odchylka



**Graf 11 Hladiny sIgG3 G6 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr  $\pm$ SD**



Zdroj: vlastní

SK – skupina, k – kontrolní soubor, o – soubor s Oralirem

## 9. DISKUSE

Alergenová imunoterapie je jedním ze současných široce uznávaných léčebných postupů pro osoby se sezónní alergickou rýmou. Na trhu je k dispozici řada přípravků jak pro subkutánní, tak pro sublingvální formu aplikace a další se neustále vyvíjejí. V této práci byl monitorován průběh sublingvální alergenové imunoterapie (SLIT) tabletami přípravku Oralair. Tablety obsahují směs standardizovaných alergenových extraktů z 5 druhů trav, což z imunologického hlediska poskytuje široký repertoár epitopů, tudíž i potencionálně větší příležitost k navození tolerance vůči vícero druhům travních pylů, než když je v tabletě obsažen extrakt pouze jednoho druhu trávy. Toto tvrzení přináší i výsledky studie z roku 2019, kde byly porovnávány tablety přípravku Oralair s přípravkem Grazax, jež obsahují extrakt jen z bojínku lučního. Bylo zjištěno, že přípravek Oralair lépe pokrývá senzibilizační profily pacientů. Dá se tedy očekávat, že tablety obsahující směs vícero druhů alergenových extraktů trav vyvolají tvorbu většího spektra blokujících protilátek, což je žádoucí mechanismus SAIT. (Batard et al., 2019)

Jedním z cílů této práce bylo zhodnotit klinický průběh SLIT. Pro posouzení klinické účinnosti SAIT existuje řada nástrojů. Za nejpoužívanější nástroj ve studiích SAIT lze považovat skóre symptomů, a to ať už samostatné, nebo v kombinaci se skórem medikace. Na rozdíl od klinických studií je v klinické praxi kladen větší důraz na jednoduchost a časovou nenáročnost používaného nástroje. Proto byla u pacientů sledovaného souboru k posouzení změn klinických příznaků alergie použita vizuální analogová škála (VAS). Tento ukazatel byl zvolen právě pro svou snadnou použitelnost a interpretaci. Autoři pozičního dokumentu z roku 2017 uvádějí, že je VAS cenným nástrojem pro dokumentaci závažnosti příznaků, účinnosti léčby a kontroly nad onemocněním jako je alergická rýma. Dále také zmiňují, že výsledky VAS dobře korelují se závažností rýmy dle klasifikace ARIA a s výsledky dotazníku RQLQ (dotazník kvality života při rinokonjunktivitidě), který se ve studiích SAIT také často využívá. (Klimek et al., 2017)

Výsledky VAS ukázaly, že mezi souborem léčených pacientů a kontrolním souborem existoval statisticky významný rozdíl v počtu zaznamenávaných bodů,

a tedy i v projevu alergických příznaků. Bylo zjištěno, že skóre léčených pacientů mělo klesající charakter, kdežto skóre kontrolní skupiny se příliš neměnilo. U souboru léčeného Oralirem bylo již v prvním roce SLIT (2013) zaznamenáno významné zmírnění alergických symptomů, o čemž nasvědčoval výsledek VAS, kde došlo ke snížení průměrného skóre bodů na téměř poloviční hodnotu. V průběhu následujících let (2014 a 2015) byly mezi soubory při srovnání průměrných skóre nalezeny nadále velice významné odlišnosti, což potvrzuje dlouholetou klinickou účinnost SLIT pomocí přípravku Oralair.

Klinické a reálné zkušenosti s přípravkem Oralair přinášejí velké množství informací prokazující účinnost a bezpečnost jeho užití při léčbě alergie na travní pyl. Příkladem toho je randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná klinická studie VO56.07A, kde byla hodnocena účinnost a nástup účinku tablet SLIT 300-IR s 5 druhy pylů trav za kontrolovaných podmínek v alergenové provokační komoře. Skupina s tabletami obsahující alergenové extrakty měla významně nižší průměrné skóre celkových symptomů rinokonjunktivitidy (ARTSS) po 4 měsících léčby (v době ukončení studie) ve srovnání s placebem. To odpovídalo relativnímu průměrnému zlepšení o 29,3 %. Navíc významný klinický účinek byl dosažen už po prvním měsíci léčby a přetrval až do 4. měsíce. (Horak et al., 2009)

Metodu VAS použili i autoři Dahl et al. (2006), kteří zkoumali klinickou účinnost a bezpečnost SLIT s přípravkem Grazax, a to dokonce vícero parametry. Ve svých výsledcích uvádějí, že bylo u jedinců léčených tabletou travního alergenu zaznamenáno statisticky významně nižší průměrné denní skóre VAS (o 31 %) ve srovnání s jedinci užívajícími placebo. Statisticky významné rozdíly mezi tabletou travního alergenu a placebem ve prospěch imunoterapie byly zaznamenány i pro ostatní cílové parametry použité v dané studii. (Dahl et al., 2006)

I přes to, že se VAS jeví jako vhodný ukazatel klinické účinnosti, je potřeba brát na vědomí, že je hodnocení jako takové poměrně subjektivní a může být ovlivněno osobním vnímáním závažnosti symptomů nebo mírou pacientovi osobní spokojenosti s výsledky léčby. Z toho vyplývá, že má VAS větší hodnotu, když jsou sledovány změny v rámci jednotlivců, než když se porovnávají jedinci mezi sebou v jednom časovém bodě. Vliv tohoto omezení na výsledky klinického hodnocení může být zmírněn, pokud

se VAS kombinuje ještě s objektivním parametrem. Dále by výsledky VAS byly objektivnější, kdyby byla studie navržena jako zaslepená a pacienti z kontrolního souboru tak nevěděli, zda dostávají lék Oralair či placebo.

Jedním z předpokládaných imunomodulačních mechanismů SAIT je indukce tvorby alergen-specifických IgG protilátek, a proto jejich monitorování může sloužit jako potenciální biomarker pro objektivní hodnocení účinnosti SAIT. Na základě toho byl stanoven další cíl této práce, který spočíval jak ve vyhodnocení změn protilátkové odpovědi jednotlivých podtříd IgG v čase, tak v porovnání získaných výsledků souboru léčeného Oralirem s kontrolním souborem pacientů.

V první řadě byla monitorována protilátková odpověď podtřídy IgG4, protože ze všech podtříd IgG je tolerance alergenu navozená prostřednictvím SAIT nejvíce spojována právě s touto podtřídou. Protilátky proti alergenům v podtřídě IgG4 lze analyzovat pomocí komerčně dostupných, validovaných setů. Tyto sety jsou používány i v rutinní klinické diagnostice právě pro monitorování alergenové imunoterapie. V této práci byl použit kit firmy Dr. Fooke (Německo), který má modulové uspořádání a umožňuje kombinovat alergeny z poměrně široké nabídky se stanovením protilátek IgG4, IgG a IgE. Při stanovení sIgG4 protilátek se postupovalo dle doporučení výrobce.

Dále byly monitorovány ostatní podtřídy sIgG (IgG1, IgG2 a IgG3). Kity pro stanovení specifických protilátek proti alergenům v těchto podtřídách nejsou komerčně dostupné a v klinické laboratorní praxi se nepoužívají. Nicméně tvorba specifických protilátek zejména podtřídy IgG1 a IgG2 může být zajímavým ukazatelem. Proto byla vytvořena a ověřena vlastní metoda, kde byly zkombinovány jamky mikrotitrační destičky potažené alergeny bojínku (G6) a směsí jarních pylů trav (GX1) od firmy Dr. Fooke (stejně byly použity i pro analýzu sIgG4) s komerčně dostupnými sekundárními značenými protilátkami proti jednotlivým podtřídám. Vznikly tři nové metody pro stanovení specifických protilátek proti alergenům v podtřídách IgG1, IgG2 a IgG3. Posledním problémem zůstalo vyjadřování hladin těchto protilátek, jelikož neexistují vhodné standardy (kalibrátory). Tento problém byl vyřešen volbou vzorku pacienta s prokázanou alergií na bojínek a alergeny jarních travin, u kterého byla zjištěna vyšší koncentrace sIgG4 proti těmto alergenům, a proto se předpokládala

zvýšená tvorba protilátek i v ostatních podtřídách. Tento vzorek (standard) byl pak analyzován vždy v duplikátech na každé destičce. Výsledná hladina protilátek byla poté vyjádřena jako index, poměr absorbance neznámého vzorku ku absorbanci popisovaného standardu. Tato metoda umožňuje sledovat vztah mezi hodnotami specifických protilátek IgG1, IgG2 a IgG3 v různých odběrech pacientů i vztah ke kontrolní skupině. Nevýhodou je absence informací o absolutní hladině (koncentraci) protilátek v daném vzorku, protože jsou k dispozici jen relativní hodnoty.

Alergen-specifické IgG4 se během imunoterapie obvykle zvyšují. (Shamji et al., 2017) V této práci bylo monitorováním sIgG4 proti směsi pylů trav (GX1) zjištěno, že u pacientů léčených Oralirem dochází v průběhu terapie ke statisticky významnému zvýšení protilátkové odpovědi. Významný imunomodulační efekt bylo možné pozorovat již po jednom měsíci medikace. Při porovnání výsledků získaných na začátku a následně po 1. roce terapie byl pozorován rozdíl v koncentraci sIgG4 GX1, jenž se ale neukázal být statisticky významný. Naopak nárůst zjištěný po 2. roce terapie už významný byl. Signifikantní zvýšení specifické protilátkové odpovědi v podtřídě IgG4 při SLIT přípravkem Oralair bylo zjištěno i ve studii, kde autoři analyzovali účinky terapie jak na specifické paměťové B buňky, tak na sérové hladiny protilátek specifických pro pyl jílku. V této studii byly pozorovány zvýšené hladiny sIgG4 jak po krátkém časovém intervalu (po 4 měsících), tak i v následujících letech terapie. (Heeringa et al., 2020)

Zvýšení protilátkové odpovědi u souboru léčeného Oralirem bylo nalezeno i při monitorování sIgG4 proti samotnému bojínku. Podobně jako u koncentrace sIgG4 GX1 bylo i u sIgG4 G6 možné zprvu pozorovat stoupající trend, po kterém pak následoval mírný pokles, přičemž ale výsledky po 1. roce od zahájení léčby prokázaly, že bylo zvýšení koncentrace sIgG4 G6 významné. Po 2. roce terapie (v odběru 02/2015) byla koncentrace stále významně zvýšená. Vlivem nárůstu koncentrace sIgG4 GX1 i G6 u souboru léčeného Oralirem, byly při porovnání výsledků s kontrolním souborem zjištěny v některých odběrech statisticky významné rozdíly. Změny ve specifické protilátkové odpovědi u pacientů s alergií na travní pyl byly odhaleny i v jedné studii, která monitorovala protilátky specifické proti rekombinantním formám alergenů skupiny 5 z bojínku lučního. Výsledky od pacientů léčených SCIT ukázaly,

že se titry sIgG4 po roce od zahájení terapie značně zvýšily, a že byl tento nárůst významný i ve srovnání s dalšími dvěma kontrolními skupinami. (Gehlhar et al., 1999)

Při monitorování sIgG1 proti směsi pylů trav (GX1) a proti samotnému bojínku (G6) byly nalezeny některé významné změny protilátkové odpovědi v průběhu SLIT. Hladiny sIgG1 dosahovaly vrcholu v průběhu pylové sezóny trav, kde bylo také možné pozorovat v případě sIgG1 G6 statisticky významný rozdíl protilátkové odpovědi ve srovnání s kontrolním souborem. Následně hladiny protilátek v průměru klesly, což se projevilo na výsledcích sIgG1 GX1 i G6 po 1. roce od zahájení léčby, kde zjištěný rozdíl nedosáhl statistické významnosti. Studie z roku 2005, kde se autoři mimo jiné zabývali změnou protilátkové odpovědi při SAIT, přinesla částečně podobné výsledky. Ve studii zjistili, že u všech subjektů léčených směsí 5 rekombinantních alergenů travních pylů došlo oproti skupině s placebem k indukci silné specifické protilátkové odpovědi v podtřídách IgG1 a IgG4, přičemž u sIgG1 hladina rovněž nejdříve vrostla a poté mírně klesla. (Jutel et al., 2005)

Výsledky monitorování sIgG2 proti směsi pylů trav (GX1) a proti bojínku (G6) přinesly zjištění, že se hladiny protilátek u léčeného souboru významně zvýšily pouze přechodně. Zvýšení bylo registrováno v pylové sezóně trav, ve které byl zároveň nalezen významný vzájemný rozdíl hladiny sIgG2 G6 obou sledovaných souborů. Podobně jako v této práci i v již zmiňované studii Heeringa et al., bylo zjištěno, že se po 4 měsících léčby hladina protilátek výrazně zvýšila, což byl pouze přechodný stav, protože se významnost po 1. roce SLIT nepotvrdila. Na druhou stranu výsledky jejich dlouhodobého zkoumání přinesly informaci, že hladina sIgG2 narozdíl od sIgG4 výrazně vzrostla až po třech sezónách SLIT. (Heeringa et al., 2020)

V dříve připomínané studii autorů Gehlhar et al. (1999) byly kromě sIgG4 monitorovány také sIgG1 a sIgG2. Oproti výsledkům v této práci bylo ve studii u léčených pacientů pozorováno, že se titry sIgG1 a sIgG2 po roce terapie ve srovnání s hodnotami naměřenými před začátkem SCIT významně zvýšily. To, že v této práci nedošlo po roce léčby k významné změně hladin sIgG1 a sIgG2, mohlo být způsobeno např. odlišnou metodou aplikace SAIT či z důvodu, že Gehlhar et al. použili k analýze protilátek purifikované rekombinantní alergeny.

Z výsledků sledování sIgG3 proti směsi pylů trav (GX1) a proti bojínku (G6) bylo zjištěno, že u pacientů léčených Oralirem nedocházelo v průběhu SLIT k významné změně protilátkové odpovědi sIgG3. Významný rozdíl nebyl nalezen ani při porovnání těchto výsledků s kontrolním souborem. Studie autorů Gadermaier et al. (2009), ve které byly sledovány sIgG3 při SCIT u pacientů alergických na břízu, rovněž nezaznamenala změny v hladinách této podtřídy. V novějších studiích je podtřída IgG3, podobně jako IgG2, využívána k monitorování imunologických změn při SAIT spíše zřídka. Na tuto skutečnost upozorňuje i studie z roku 2021, která byla navržena tak, aby podpořila zájem o sledování podtříd IgG2 a IgG3 v budoucích studiích. (MacGlashan et al., 2021) Zjištění, které do jisté míry koresponduje s výsledky této práce, přinášejí autoři, v jejichž studii bylo odhaleno, že SCIT prováděná pomocí modifikovaných alergenů pylu břízy významně zvýšila hladiny sIgG1, sIgG2 a IgG4, přičemž odpověď sIgG3 se zásadně nezměnila. (Reisinger et al., 2005)

Posledním cílem této práce bylo vyhodnotit případné změny hladin specifických IgG protilátek v souvislosti s klinickým průběhem alergenové imunoterapie. Výsledky této práce prokazatelně podporují dosavadní poznatky o jednom z možných mechanismů SAIT, kterým je právě nasměrování protilátkové odpovědi ve prospěch třídy IgG. V této práci pozorovaný trend vývoje podtřídy IgG4 koresponduje s pozitivní klinickou odezvou pacientů léčených Oralirem. Vzhledem k tomu, že se protilátkové odpovědi podtříd IgG1 a IgG2 významně zvýšily pouze v sezóně travních pylů, není možné s jistotou říct, do jaké míry se tyto podtřídy sIgG podílejí na navození dlouhodobé imunitní tolerance vůči příčinnému alergenů. Studie, která zkoumala obdobnou problematiku, zjistila korelaci mezi subjektivním klinickým hodnocením a objektivním nálezem protilátkových odpovědí pouze v podtřídě IgG4, zatímco u ostatních podtříd se korelace nepotvrdila. (Baron-Bodo et al., 2013). Taktéž již zmiňovaná studie Heeringa et al. (2020) přináší výsledky, kde je možné pozorovat souvislost mezi klinickým zlepšením a zvýšením protilátkové odpovědi v podtřídách IgG2 a IgG4.

## 10. ZÁVĚR

Diplomová práce se zaměřila na monitorování průběhu sublingvální alergenové imunoterapie (SLIT) pomocí sledování hladin jednotlivých podtříd specifických IgG protilátek u polinotiků s potvrzenou alergií na pyly trav. Záměrem této práce bylo zhodnotit jak protilátkovou odpověď, tak klinické hodnocení průběhu SLIT, a následně jejich možnou souvislost.

V závěru lze říci, že SLIT přípravkem Oralair byla klinicky účinná už od první léčebné sezóny. Při monitorování sIgG byl u léčených pacientů zaznamenán signifikantní nárůst specifické protilátkové odpovědi v podtřídě IgG4 již po jednom měsíci terapie. Významný nárůst koncentrace sIgG4 byl nalézán i v dalším průběhu terapie, což odpovídalo kladnému hodnocení klinického průběhu alergenové imunoterapie léčených pacientů. Současně bylo u sIgG4 možné pozorovat významné odlišnosti mezi souborem pacientů léčených Oralirem a kontrolním souborem polinotiků. U sIgG1 a sIgG2 byly v průběhu terapie také nalézány některé významné změny protilátkové odpovědi, které by mohly souviset s navozením tolerance a zmírnění projevů alergických symptomů. Naopak protilátková odpověď v podtřídě IgG3 se v průběhu SLIT významně neměnila.

Tato práce přináší výsledky, které ukazují, že by sledování podtříd sIgG mohlo sloužit jako prospěšný objektivní parametr pro monitorování průběhu SAIT. Protože jsou v mechanismu léčby zahrnuty i další imunitní složky kromě blokujících sIgG, bude vhodné v budoucnu soustředit další úsilí do studia ostatních imunitních mechanismů. Přestože je obtížné spoléhat se pouze na protilátkovou odpověď při odhadu individuálních klinických odpovědí, prozatím se jeví z hlediska personalizované medicíny využití podtříd sIgG jako perspektivní biomarker.



## 11. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky / český význam
AK	aminokyselina
APC	antigen-presenting cell / antigen prezentující buňka
ARIA	Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma / Alergická rýma a její dopad na astma
ARTSS	Average rhinoconjunctivitis total symptom score / celkové průměrné skóre symptomů rinokonjunktivitidy
BCR	B-cell receptor / B-buněčný receptor
C	constant (region) / konstantní (oblast)
CD	cluster designation / diferenciační skupina
CLR	C-lektinové receptory
CSMS	Combined symptom and medication score / kombinované skóre symptomů a medikace
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4 / cytotoxický T lymfocytární antigen 4
DC	dendritic cell / dendritická buňka
dMS	denní skóre medikace
dSS	denní skóre symptomů
ECP	eosinophil cationic protein / eozinofilní kationtový protein
EDN	eosinophil-derived neurotoxin / neurotoxin odvozený od eozinofilů
EMA	European Medicines Agency / Evropská léková agentura
EPO	eosinophil peroxidase / eozinofilní peroxidáza
Fc $\gamma$ R	receptory pro IgG protilátky
Fc $\epsilon$ RI	vysokoafinní receptory pro IgE protilátky
FOXP3	forkhead box protein 3
G6	specifické alergeny bojínku
GATA-3	GATA binding protein 3 / GATA vázající protein 3
GC	germinální centrum
GINA	Global Initiative for Asthma / Globální iniciativa pro astma
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor / faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GX1	směs alergenů jarních pylů trav
IFN $\gamma$	interferon gama
Ig	imunoglobulin

IgE (A, D, G, M)	imunoglobulin E (A, D, G, M)
IgE-BF	IgE-blokující faktor
IgE-FAB	The IgE-facilitated allergen binding assay/ test vazby alergenu usnadněný IgE
IgG4 (1, 2, 3)	imunoglobuliny G 4. (1., 2., 3.) podtřídy
IL	interleukin
IR	index reaktivity
IRF4	interferon regulatory factor 4 / interferonový regulační faktor 4
MBP	major basic protein / hlavní bazický protein
NFκB	nukleární faktor kappa B
NK	natural killer / přirozený zabíječ
NLR	NOD-like receptory
nTreg a iTreg	natural / přirozený a induced / indukovaný regulační T lymfocyt
PAR	proteázou aktivované receptory
PD1	programmed death 1 / programovaná smrt 1
PRR	pattern recognition receptors / receptory rozeznávající molekulové vzory
RORγt (RORα)	retinoid-related orphan receptor gamma t (alfa) / gama t (alfa) receptor souvisejících s retinoidy
RQLQ	Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire / dotazník kvality života při rinokonjunktivitidě
S	switch (region) / přepínací (oblast)
SAIT	specific allergen immunotherapy / specifická alergenová imunoterapie
SCIT	subcutaneous immunotherapy / subkutánní imunoterapie
sIgE (sIgG)	alergen-specifické imunoglobuliny E (G)
SLIT	sublingual immunotherapy / sublingvální imunoterapie
STAT-3 (6)	signal transducer and activator of transcription 3 (6) / převodník signálu a aktivátor transkripce 3 (6)
Tc	cytotoxický T lymfocyt
TCR	T-cell receptor / T-buněčný receptor
TF	transkripční faktor
Tfh	follicular helper T lymphocyte / folikulární pomocný T lymfocyt
TGF-β	transforming growth factor beta/ transformující růstový faktor beta
Th	helper T lymphocyte / pomocný T lymfocyt
TLR	Toll-like receptory
TNF-α	tumor necrosis factor alfa / tumor nekrotizující faktor alfa
Treg	regulační T lymfocyt

VAS	vizuální analogová škála
WHO	World Health Organization / Světová zdravotnická organizace

## 12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Mediátory zánětu žírných buněk.....	16
Tabulka 2 Relativní zastoupení podtříd IgG a jejich biologické vlastnosti.....	27
Tabulka 3 Výsledky VAS za jednotlivé roky u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání.....	46
Tabulka 4 Koncentrace sIgG4 GX1 v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání.....	48
Tabulka 5 Koncentrace sIgG4 G6 v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání.....	51
Tabulka 6 Hladiny sIgG1 GX1 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání.....	54
Tabulka 7 Hladiny sIgG1 G6 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání.....	56
Tabulka 8 Hladiny sIgG2 GX1 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání.....	58
Tabulka 9 Hladiny sIgG2 G6 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání.....	60
Tabulka 10 Hladiny sIgG3 GX1 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání.....	62
Tabulka 11 Hladiny sIgG3 G6 vyjádřené indexy v jednotlivých odběrech u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru, jejich statistické porovnání.....	64

## **13. SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Cytokiny a transkripční faktory ovlivňující diferenciaci pomocných T lymfocytů současně s přehledem jejich efektorových produktů.....	22
Obrázek 2 Mechanismy působení SAIT.....	33

## 14. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Porovnání výsledků VAS u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru.....	47
Graf 2 Dynamika slgG4 GX1 u pacientů léčených Oralirem během 1. roku sledování – průměr ±SD.....	49
Graf 3 Koncentrace slgG4 GX1 u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru ve vybraných odběrech – průměr ±SD.....	50
Graf 4 Dynamika slgG4 G6 u pacientů léčených Oralirem během 1. roku sledování – průměr ±SD.....	52
Graf 5 Koncentrace slgG4 G6 u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru ve vybraných odběrech – průměr ±SD.....	53
Graf 6 Hladiny slgG1 GX1 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr ±SD.....	55
Graf 7 Hladiny slgG1 G6 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr ±SD.....	57
Graf 8 Hladiny slgG2 GX1 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr ±SD.....	59
Graf 9 Hladiny slgG2 G6 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr ±SD.....	61
Graf 10 Hladiny slgG3 GX1 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr ±SD.....	63
Graf 11 Hladiny slgG3 G6 vyjádřené indexy u pacientů léčených Oralirem a u kontrolního souboru v jednotlivých odběrech – průměr ±SD.....	65

## 15. POUŽITÁ LITERATURA

- ABSOLONOVÁ, Karolína, Petr MATUCHA a Ivan ŠTERZL.** Th1, Th2 and Th17 lymphocytes in autoimmune thyreopathies. *Vnitřní lékařství* [online]. 2021, **67**(8), E23-E28 [cit. 2022-12-18]. ISSN 0042773X. Dostupné z: doi:10.36290/vnl.2021.131
- AKDIS, Cezmi A.** The underlying mechanisms in allergy. In: AKDIS, Cezmi A. a Ioana AGACHE. *EAACI Global Atlas of Allergy*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Zurich, 2014, s. 39-42.
- ALVARO-LOZANO, Montserrat, Cezmi A. AKDIS, Mubeccel AKDIS, et al.** Allergen Immunotherapy in Children User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology* [online]. 2020, **31**(S25), 1-101 [cit. 2023-01-26]. ISSN 0905-6157. Dostupné z: doi:10.1111/pai.13189
- ANDERSSON, Kerstin a Jonas LIDHOLM.** Characteristics and Immunobiology of Grass Pollen Allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* [online]. 2003, **130**(2), 87-107 [cit. 2023-02-11]. ISSN 1018-2438. Dostupné z: doi:10.1159/000069013
- AWASTHI, A. a V. K. KUCHROO.** Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International Immunology* [online]. 2009, **21**(5), 489-498 [cit. 2022-12-18]. ISSN 0953-8178. Dostupné z: doi:10.1093/intimm/dxp021
- BARON-BODO, V., S. HORIOT, A. LAUTRETTE, et al.** Heterogeneity of antibody responses among clinical responders during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clinical & Experimental Allergy* [online]. 2013, **43**(12), 1362-1373 [cit. 2023-04-01]. ISSN 09547894. Dostupné z: doi:10.1111/cea.12187
- BATARD, Thierry, Amparo SANJUAN, Laure DENIS, Hélène NGUYEN, Armelle MONTAGUT, Joaquín SASTRE, Sabina RAK a Jean F. CUINÉ.** Two grass pollen tablets commercially available for allergy immunotherapy display different IgE epitope repertoires. *Clinical and Translational Allergy* [online]. 2019, **9**(1) [cit. 2023-03-25]. ISSN 2045-7022. Dostupné z: doi:10.1186/s13601-019-0253-z

**BROŽEK, Jan L., Jean BOUSQUET, Ioana AGACHE, et al.** Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2017, **140**(4), 950-958 [cit. 2023-04-02]. ISSN 00916749.

Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2017.03.050

**BYSTROŇ, Jaromír.** Alergenová imunoterapie. *Remedia*. 2012, **22**(4), 264-268. ISSN 0862-8947. Dostupné také z: <http://www.remédia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2012/4-2012/Alergenova-imunoterapie/e-1dQ-1kd-1kq.magarticle.aspx>

**BYSTROŇ, Jaromír.** Pylová alergická rýma. *Interní medicína pro praxi*, 2006, 4: 167-171.

**DAHL, Ronald, Alexander KAPP, Giselda COLOMBO, et al.** Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2006, **118**(2), 434-440 [cit. 2023-03-25]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2006.05.003

**DELVES, Peter J., Seamus J. MARTIN, Dennis R. BURTON a Ivan M. ROITT.** *Roitt's essential immunology*. Thirteenth edition. Chichester: Wiley Blackwell, 2017. ISBN 9781118415771.

**DULLAERS, Melissa, Ruth DE BRUYNE, Faruk RAMADANI, Hannah J. GOULD, Philippe GEVAERT a Bart N. LAMBRECHT.** The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2012, **129**(3), 635-645 [cit. 2023-01-21]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2011.10.029

**FREW, Anthony J.** Allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2010, **125**(2), S306-S313 [cit. 2023-01-30]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2009.10.064

**GADERMAIER, E., S. FLICKER, W. ABERER, et al.** Analysis of the Antibody Responses Induced by Subcutaneous Injection Immunotherapy with Birch and Fagales Pollen Extracts Adsorbed onto Aluminum Hydroxide. *International Archives of Allergy and Immunology* [online]. 2009, **151**(1), 17-27 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1018-2438. Dostupné z: doi:10.1159/000232567

**GALLI, Stephen J.** Mast cells. In: AKDIS, Cezmi A. a Ioana AGACHE. *EAACI Global Atlas of Allergy*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Zurich, 2014, s. 5355.



**GEHLHAR, SCHLAAK, BECKER a BUFE.** Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clinical & Experimental Allergy* [online]. 1999, **29**(4), 497-506 [cit. 2023-03-29]. ISSN 09547894. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2222.1999.00525.x

**HE, Jin-Shu, Sriram NARAYANAN, Sharrada SUBRAMANIAM, Wen Qi HO, Juan J. LAFAILLE a Maria A. CUROTTO DE LAFAILLE.** Biology of IgE Production: IgE Cell Differentiation and the Memory of IgE Responses. In: LAFAILLE, Juan J. a Maria A. CUROTTO DE LAFAILLE, ed. *IgE Antibodies: Generation and Function* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015, 2015-1-3, s. 1-19 [cit. 2023-01-19]. Current Topics in Microbiology and Immunology. ISBN 978-3-319-13724-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-13725-4\_1

**HEERINGA, Jorn J., Craig I. MCKENZIE, Nirupama VARESE, et al.** Induction of IgG 2 and IgG 4 B-cell memory following sublingual immunotherapy for ryegrass pollen allergy. *Allergy* [online]. 2020, **75**(5), 1121-1132 [cit. 2023-03-29]. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/all.14073

**HORAK, Friedrich, Petra ZIEGLMAYER, René ZIEGLMAYER, et al.** Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2009, **124**(3), 471-477.e1 [cit. 2023-03-25]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2009.06.006

**HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK.** *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.

**HRABINA, M., G. PELTRE, R. VAN REE a P. MOINGEON.** Grass pollen allergens. *Clinical & Experimental Allergy Reviews* [online]. 2008, **8**(1), 7-11 [cit. 2023-02-11]. ISSN 14729725. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-9733.2008.00126.x

**JUTEL, Marek, Lothar JAEGER, Roland SUCK, Hanns MEYER, Helmut FIEBIG a Oliver CROMWELL.** Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2005, **116**(3), 608-613 [cit. 2023-03-30]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2005.06.004

**JUTEL, Marek.** Mechanisms of allergen immunotherapy. In: AKDIS, Cezmi A. a Ioana AGACHE. *EAACI Global Atlas of Allergy*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Zurich, 2014, s. 300-302.

**KLIMEK, Ludger, Karl-Christian BERGMANN, Tilo BIEDERMANN, et al.** Visual analogue scales (VAS): Measuring instruments for the documentation of symptoms and therapy monitoring in cases of allergic rhinitis in everyday health care. *Allergo Journal International* [online]. 2017, **26**(1), 16-24 [cit. 2023-03-22]. ISSN 2197-0378.

Dostupné z: doi:10.1007/s40629-016-0006-7

**KRČMOVÁ, Irena a Jakub NOVOSAD.** Alergická rýma a alergické bronchiální astma, astmatický ekvivalent. *Medicína pro praxi*, 2013, 10(8-9): 286-290.

**KRČMOVÁ, Irena a Jakub NOVOSAD.** Modern aspects of allergic rhinitis. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2018, **20**(2), 74-80 [cit. 2023-02-15]. ISSN 12127299.

Dostupné z: doi:10.36290/int.2018.014

**KREJSEK, Jan, Ctirad ANDRÝS a Irena KRČMOVÁ.** *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon, 2016. ISBN 978-80-86472-74-4.

**MACGLASHAN JR, Donald, Santiago ALVAREZ-ARANGO a Jody TVERSKY.** Subclasses of allergen-specific IgG: Serum IgG2 and IgG3 levels are not predicted by IgG1/IgG4 levels. *Clinical & Experimental Allergy* [online]. 2021, **51**(8), 1093-1095 [cit. 2023-04-01]. ISSN 0954-7894. Dostupné z: doi:10.1111/cea.13977

**MACKAY, Ian R., Fred S. ROSEN a A.B. KAY.** Allergy and Allergic Diseases. *New England Journal of Medicine* [online]. 2001, **344**(2), 109-113 [cit. 2023-01-29]. ISSN 0028-4793.

Dostupné z: doi:10.1056/NEJM200101113440206

**MAKATSORI, Melina, Oliver PFAAR, Ramon LLEONART a Moises A. CALDERON.**

Recombinant Allergen Immunotherapy: Clinical Evidence of Efficacy—A Review. *Current Allergy and Asthma Reports* [online]. 2013, **13**(4), 371-380 [cit. 2023-02-01]. ISSN 1529-7322. Dostupné z: doi:10.1007/s11882-013-0359-7

**MATRICARDI, P. M., J. KLEINE-TEBBE, H. J. HOFFMANN, et al.** EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology* [online]. 2016, 27, 1-250 [cit. 2022-12-05]. DOI:10.1111/pai.12563. ISSN 09056157.

Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/pai.12563>

- ORALAIR 100 IR & 300 IR sublingvální tablety** [příbalová informace]. Francie: Stallergenes, 2010 (první registrace), 2013 (poslední prodloužení registrace)
- PALOMARES, Oscar.** The role of regulatory T cells in IgE-mediated food allergy. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*. 2013, 23(6), 371-382.
- PITSIOS, C., P. DEMOLY, M. B. BILÒ, et al.** Clinical contraindications to allergen immunotherapy: an EAACI position paper. *Allergy* [online]. 2015, **70**(8), 897-909 [cit. 2023-02-04]. ISSN 01054538. Dostupné z: doi:10.1111/all.12638
- PITSIOS, Constantinos.** Allergen Immunotherapy: Biomarkers and Clinical Outcome Measures. *Journal of Asthma and Allergy* [online]. 2021, **14**, 141-148 [cit. 2023-02-05]. ISSN 1178-6965. Dostupné z: doi:10.2147/JAA.S267522
- REISINGER, Jürgen, Friedrich HORAK, Gabrielle PAULI, Marianne VAN HAGE, Oliver CROMWELL, Franz KÖNIG, Rudolf VALENTA a Verena NIEDERBERGER.** Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2005, **116**(2), 347-354 [cit. 2023-04-02]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2005.04.003
- RYBNÍČEK, Ondřej a Ester SEBEROVÁ.** *Průvodce alergenovou imunoterapií: doporučení České společnosti alergologie a klinické imunologie ČLS JEP*. 3. přepracované vydání. Praha: Tigis, spol. s r.o., 2021. ISBN 978-80-87323-18-2.
- SASTRE, B, JM RODRIGO-MUÑOZ, DA GARCIA-SANCHEZ, JA CAÑAS a V DEL POZO.** Eosinophils: Old Players in a New Game. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* [online]. 2018, **28**(5), 289-304 [cit. 2022-12-05]. ISSN 10189068. Dostupné z: doi:10.18176/jiaci.0295
- SHAMJI, M. H., J. H. KAPPEN, M. AKDIS, et al.** Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI Position Paper. *Allergy* [online]. 2017, **72**(8), 1156-1173 [cit. 2023-02-06]. ISSN 01054538. Dostupné z: doi:10.1111/all.13138
- SCHMIDT-WEBER, Carsten B.** T cells. In: AKDIS, Cezmi A. a Ioana AGACHE. *EAACI Global Atlas of Allergy*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Zurich, 2014, s. 60-61.

**STONE, K. D., PRUSSIN C. a METCALFE D. D.** IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2010, 125(2), 73-80 [cit. 2022-12-06]. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.11.017. ISSN 00916749.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847274/>

**SUTTON, Brian, Anna DAVIES, Heather BAX a Sophia KARAGIANNIS.** IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation. *Antibodies* [online]. 2019, 8(1) [cit. 2023-01-22]. ISSN 2073-4468. Dostupné z: doi:10.3390/antib8010019

**ŠPIČÁK, Václav a Martin HRUBIŠKO.** *Alergie: čím více o ní budete vědět, tím méně vás bude trápit.* Praha: Institut UCB pro alergii, c2007. ISBN 978-80-254-1105-6.

**TAMASAUSKIENE, Laura a Brigita SITKAUSKIENE.** Role of Th22 and IL-22 in pathogenesis of allergic airway diseases: Pro-inflammatory or anti-inflammatory effect?. *Pediatrics & Neonatology* [online]. 2018, 59(4), 339-344 [cit. 2023-01-02]. ISSN 18759572. Dostupné z: doi:10.1016/j.pedneo.2017.11.020

**VAN REE, Ronald.** Allergens – structure and function. In: AKDIS, Cezmi A. a Ioana AGACHE. *EAACI Global Atlas of Allergy.* European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Zurich, 2014, s. 6-8.

**VIDARSSON, Gestur, Gillian DEKKERS a Theo RISPENS.** IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology* [online]. 2014, 5 [cit. 2023-01-26]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2014.00520

**VIRCHOW, J. Christian.** What is asthma. In: AKDIS, Cezmi A. a Ioana AGACHE. *EAACI Global Atlas of Asthma.* European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Zurich, 2013, s. 2-3.

**ZHAO, Picheng, Xiang XIAO, Rafik M. GHOBRIAL a Xian C. LI.** IL-9 and Th9 cells: progress and challenges. *International Immunology* [online]. 2013, 25(10), 547-551 [cit. 2022-12-17]. ISSN 1460-2377. Dostupné z: doi:10.1093/intimm/dxt039

**ZHU, Jinfang a William E. PAUL.** CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* [online]. 2008, 112(5), 1557-1569 [cit. 2022-12-14]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-05-078154)